

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**RIZÓBIOS ISOLADOS DE FABÁCEAS FORRAGEIRAS
DO SEMIÁRIDO: BIODIVERSIDADE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA**

SUELANE DE MELO DIAS

**AREIA - PB
ABRIL DE 2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**RIZÓBIOS ISOLADOS DE FABÁCEAS FORRAGEIRAS
DO SEMIÁRIDO: BIODIVERSIDADE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA**

SUELANE DE MELO DIAS

ZOOTECNISTA

**AREIA - PB
ABRIL DE 2018**

SUELANE DE MELO DIAS

**RIZÓBIOS ISOLADOS DE FABÁCEAS FORRAGEIRAS DO
SEMIÁRIDO: BIODIVERSIDADE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

PROF. Dr. ALBERÍCIO PEREIRA DE ANDRADE

PROF. Dr. ADAILSON PEREIRA DE SOUZA

PROF. Dr. DIVAN SOARES DA SILVA

AREIA - PB

ABRIL DE 2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D541r Dias, Suelane de Melo.

RIZÓBIOS ISOLADOS DE FABÁCEAS FORRAGEIRAS DO
SEMIÁRIDO: BIODIVERSIDADE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA /
Suelane de Melo Dias. - João Pessoa, 2019.
83 f. : il.

Orientação: Albericio Pereira de Andrade.
Coorientação: Adailson Pereira de Souza, Divan Soares
da Silva.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Caatinga. 2. Diversidade microbiana. 3. Leguminosas
nativas. 4. Nitrogênio. I. Albericio Pereira de
Andrade. II. Adailson Pereira de Souza. III. Divan
Soares da Silva. IV. Título.

UFPB/CCA-AREIA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

TÍTULO: “Rizóbios isolados de leguminosas forrageiras do semiárido: Biodiversidade e Eficiência Simbiótica”

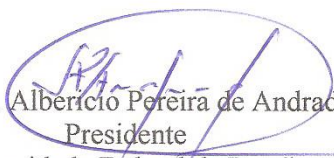
AUTOR: Suelane de Melo Dias


ORIENTADOR: Prof. Dr. Albericio Pereira de Andrade


JULGAMENTO

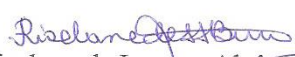
CONCEITO: APROVADO

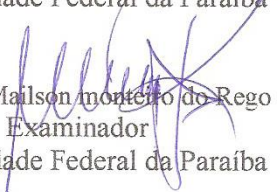
EXAMINADORES:


Prof. Dr. Albericio Pereira de Andrade
Presidente
Universidade Federal da Paraíba


Prof. Dr. Rinaldo Luiz Caraciolo Ferreira
Examinador
Universidade Federal Rural do Pernambuco


Profª. Dra. Mércia Virginia Ferreira dos Santos
Examinadora
Universidade Federal Rural do Pernambuco


Profª. Dra. Riselane de Lucena Aleântara Bruno
Examinadora
Universidade Federal da Paraíba


Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rego
Examinador
Universidade Federal da Paraíba

Areia, 06 de abril de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Suelane de Melo Dias - filha de Manoel Antônio Dias e Izabel Soares de Melo Dias, nasceu no município de Saloá, Pernambuco, no dia 21 de Dezembro de 1989. Em Janeiro de 2008, ingressou na Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, onde em Junho de 2013, obteve o título de Bacharel em Zootecnia. No mesmo ano ingressou no Mestrado em Ciência Animal e Pastagens, na Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, concentrando seus estudos na área de Ecofisiologia e Sistemas de Produção de Plantas Forrageiras e Desempenho de Animais em Pastagens. Em Março de 2014, teve parte das atividades de Mestrado realizadas na Universidade Federal da Paraíba – Centro de Ciências Agrárias/Areia – PB, desenvolvendo o experimento, realizando atividades de estágio docência e cursando disciplina no referido local. Em Março de 2015 ingressou como discente no Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia na Universidade Federal da Paraíba. Em Abril de 2018, submeteu-se à defesa da tese para a obtenção do título de Doutora.

É assim, porque tem de ser assim. Não há apenas um lado bom da vida. Todos os lados são bons, também os do avesso, porque é preciso o avesso para que haja a trama, a história, e a vida complete o ciclo.

Carmem Beatriz Fávero

O Senhor fez por mim maravilhas e Santo é o seu nome.

(Lucas 1:49)

A DEUS, meu refúgio e minha Forteleza!

A minha FAMÍLIA meu porto seguro, especialmente aos meus pais Manoel e Izabel.

E ao meu esposo Luiz Carlos pelo amor, dedicação e companheirismo.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal da Paraíba, em especial aos que fazem o Centro de Ciências Agrárias - Areia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, professores colaboradores e todos que fazem parte da sua administração.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo fomento da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela manutenção financeira do experimento.

O desenvolvimento dessa Tese não teria sido possível sem o apoio, inestimável, fornecido pelas seguintes pessoas:

Albericio Pereira de Andrade, professor e orientador;

Adailson Pereira de Souza, professor e colaborador;

Mailson Monteiro do Rego, professor e colaborador;

Riselane de Lucena Alcântara Bruno, professora e colaboradora;

Paulo Ivan Fernandes Junior, Pesquisador da Embrapa Semiárido, colaborador;

Sou imensamente grata a Idaline Pessoa, Jakeline Medeiros e em especial ao Grupo de Pesquisa, Lavoura Xerófila - UFPB, amigos de todas as horas.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO GERAL	xv
GENERAL ABSTRACT	xvii
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	19
CAPÍTULO I.....	21
Referencial Teórico.....	21
1.1 Caracterização da Vegetação Caatinga	22
1.2 Importância da Fixação Biológica de Nitrogênio para as Pastagens do Nordeste Brasileiro	22
1.3 Fixação Biológica de Nitrogênio	24
1.4 Histórico Taxonômico de Rizóbios.....	27
1.5 Genes Nif e Nod em Bactérias: Diversidade, Funções e Utilização para fins Taxonômicos	29
1.5.1 Genes Nod	30
1.5.2 Genes Nif.....	32
1.6 Utilização de genes específicos para fins Taxonômicos	34
BIBLIOGRAFIA	37
CAPÍTULO II.....	43
ATRIBUTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE ISOLADOS DE.....	43
RIZÓBIOS NATIVOS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO	43
Resumo.....	43
Abstract	44
2.1 Introdução.....	46
2.2 Material e Métodos.....	47

2.2.1	Procedimento da coleta do solo	47
2.2.2	Isolamento e purificação.....	49
2.2.3	Teste de tolerância à salinidade	50
2.2.4	Teste de tolerância à acidez e ao alumínio	51
2.2.5	Teste de solubilização de fosfato de cálcio	52
2.2.6	Eficiência simbiótica das bactérias inoculadas em Feijão-Macassa .	52
2.3	Resultados e Discussão.....	54
2.4	Conclusão	63
	Bibliografia.....	64
	CAPÍTULO III	68
	DIVERSIDADE GENÉTICA DE RIZÓBIOS NATIVOS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO ACESSADA POR PCR-RFLP	68
	Resumo.....	68
	Abstract	69
3.1	Introdução.....	70
3.2	Material e Métodos.....	71
3.2.1	Seleção dos isolados de rizóbios por meio da amplificação simultânea de fragmentos dos genes <i>nifH</i> e <i>nodC</i>	71
3.2.2	Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (PCR- RFLP) 73	
3.2.3	Produção de compostos indólicos “ <i>in vitro</i> ”	74
3.3	Resultados e Discussão.....	76
3.4	Conclusão	79
	Bibliografia.....	80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 2.1. Análise química do solo coletado em pontos específicos dos municípios de Boa vista, Pocinhos e São Sebastião de Lagoa de Roça-Paraíba.....46

Tabela 2.2. Análise física do solo coletado em pontos específicos dos municípios de Boa vista, Pocinhos e São Sebastião de Lagoa de Roça,Paraíba.....46

Tabela 2.3. Análise de água de poços artesianos usados para confecção do meio YMA usados para o teste de tolerância à salinidade.....48

Tabela 2.4. Escala usada na avaliação do crescimento de rizóbios no meio YMA resistentes à salinidade e acidez + alumínio (pH 6,5; pH 6,5+Al; pH 4,5+Al; pH 4,5)..49

Tabela 2.5. Índice de solubilização de fosfato de cálcio de isolados de rizóbio obtidos de áreas de caatinga do Semiárido paraibano.....58

Tabela 2.6. Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa seca dos nódulos (MSN), obtidos no ensaio eficiência simbiótica com feijão-macassa.....59

CAPÍTULO III

Tabela 3.1. Composição do mix de reação e programação da PCR para a amplificação de segmentos dos genes *nifH* e *nodC* no sistema Duplex e *NodC Burkholderia* pelo sistema Uniplex.....69

Tabela 3.2. Composição do mix de reação e programação da PCR para a amplificação de segmentos do gene 16S rRNA em sistema uniplex.....71

Tabela 3.3. Matriz de dissimilaridade entre os isolados de rizóbios, obtidos através dos perfis de restrição do gene 16S rRNA utilizando as endonucleases *HinfI*, *HhaI* e *MspI* e analisados pelo Complemento do Coeficiente de Jaccard.....75

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.1. Troca de sinais no processo de simbiose entre *Rhizobium*-Planta. Flavonóides produzidos pela planta hospedeira induzindo genes Nod em rizóbios. Indução de produção de fatores Nod. Cordão de infecção no córtex da raiz (Frache et al., 2009).....24

Figura 1.2. Diagrama esquemático para explicar o número e distribuição de espécies bacterianas nodulantes de leguminosas nas classes de Proteobactérias α e β . Fonte: (Shamseldin et al., 2016).....27

Figura 1.3. Rota biossintética da estrutura básica de um fator de nodulação Fonte: (Grange, 2005).....29

CAPÍTULO II

Figura 2.1. Indicação das áreas de coleata dos solos, nos municípios de Boa Vista, Pocinhos e São Sebastião de Lagoa de Roça – Paraíba.....44

Figura 2.2. Amostra das sementes utilizadas no experimento com planta Isca.....46

Figura 2.3. Morfologia de colônias de bactérias utilizadas na caracterização cultural em meio de cultura. Fonte: Adaptado de Hungria e Silva (2011).....47

Figura 2.4. Ilustração do método de repicagem de bactéria para avaliação da tolerância à salinidade, acidez e ao alumínio. Fonte: (Hara & Oliveira, 2004).....49

Figura 2.5. Escala para avaliação da tolerância à salinidade, acidez e alumínio, por isolados de rizóbio distribuídos em meio de cultura. Fonte: (Hara & Oliveira, 2004).....49

Figura 2.6. Distribuição dos Isolados de rizóbios obtidos de nódulos radiculares das fabáceas: *Desmanthus pernambucanus*, *Mimosa caesalpiniiifolia* e *Mimosa tenuiflora*, quanto às características morfológicas. (EPS = Exopolissacarídeos).....52

Figura 2.7. Dendrograma de dissimilaridade com base em características morfológicas dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos radiculares das fabáceas: *Desmanthus pernambucanus*, *Mimosa caesalpiniiifolia* e *Mimosa tenuiflora*; Ponto de corte = Média + kDP k = 1,25 Mojema (1977). Correlação cofenética (ccc) = 92%.....54

Figura 2.9. Respostas dos isolados de rizóbios submetidos à variação de pH do meio de cultura e toxicidade por alumínio. (I) corresponde ao meio de cultura com pH = 6,5+Al³⁺; (II) pH = 4,5+Al³⁺ e (III) pH = 4,5. Escore 0 = intolerante; Escore de 1 a 2 = sensível; Escore de 2 a 3 = medianos e Escore de 3 a 4 = Tolerantes.....56

Figura 2.10. Probabilidade de tolerância de isolados de rizóbios submetidos ao meio salino A e B (A e B correspondem a diferentes águas usadas para a confecção dos meios de cultura, tabela 2.3). Escores de 1 a 2 = Sensível; Escore de 2 a 3 = Mediano; Escore de 3 a 4 = Tolerante.....58

CAPÍTULO II

Figura 3.1. Curva padrão com diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de compostos indólicos (CIs), quantificados em espectrofotômetro a 530 nm.....7

Figura 3.2. Amplificação dos genes *nifH* e *nodC*; Os números de 1 à 78 representam os isolados provenientes de nódulos de *Desmanthus pernambucanus*, *Mimosa tenuiflora* e *Mimosa caesalpinifolia*; M = marcador de peso molecular de 1kb.....74

Figura 3.3. Perfis de restrição do gene 16S-rRNA de isolados de rizóbios nativos utilizando as endonucleases *HinfI*, *HhaI* e *MspI*. (M - marcador de peso molecular de 100pb).....75

Figura 3.4. Dendrograma de dissimilaridade entre os isolados de rizóbios gerado a partir da matriz de dissimilaridade pelo método de agrupamento de Ward, com o número de grupos definido pelo método de Mojena, onde o ponto de corte = média + kDP $k = 1,25$. Valores em porcentagem nas bifurcações da matriz representa a robustez da análise filogenética através da análise de Bootstrap.....77

Figura 3.5. Representação tridimensional na análise de coordenadas principais baseado na matriz de dissimilaridade entre os isolados de rizóbios obtidos através dos perfis de restrição do gene 16S rRNA utilizando as endonucleases *HinfI*, *HhaI* e *MspI*.....78

Figura 3.6. Produção de compostos indólicos “*in vitro*”, com L-triptofano, por isoladas de rizóbios nativos. Resultados em cores distintas, diferem estatisticamente pelo teste Scotknot 5%.....79

Figura 3.7. Produção de compostos indólicos “*in vitro*”, sem L-triptofano, por isoladas de rizóbios nativos. Resultados em cores distintas, diferem estatisticamente pelo teste Scotknot 5%.....80

RIZÓBIOS ISOLADOS DE FABÁCEAS FORRAGEIRAS DO SEMIÁRIDO: BIODIVERSIDADE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA

RESUMO GERAL

A fixação biológica de nitrogênio é um processo natural que ocorre entre associações de plantas e bactérias diazotróficas. A maioria das fabáceas forrageiras encontradas na Caatinga possuem alto valor econômico, podendo ser usadas para aumentar o aporte de nitrogênio e matéria orgânica no solo, através da fixação biológica de nitrogênio e ciclagem de nutrientes. Assim o objetivo deste trabalho foi caracterizar morfofisiologicamente isolados de rizóbios nativos das espécies forrageiras *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung., *Mimosa caesalpinifolia* Benth. e *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir. Avaliar a resistência ao estresse salino, acidez, toxicidade por alumínio e capacidade de solubilização do fosfato de cálcio *in vitro*, bem como testar a eficiência simbiótica dos isolados. Autenticar os isolados de rizóbios nativos através da amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* por meio da técnica duplex PCR. Determinar a diversidade genética dos isolados pela técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (PCR-RFLP) utilizando as endonucleases *HhaI*, *MspI* e *HinfI* e quantificar a produção de compostos indólicos *in vitro*. O solo usado como substrato para o cultivo das fabáceas foi coletado em pontos específicos dos municípios de Boa Vista, São Sebastião de Lagoa de Roça e Pocinhos no estado da Paraíba. Os nódulos foram obtidos do cultivo de planta isca em casa de vegetação. As bactérias, provenientes dos nódulos, foram isoladas e purificadas em laboratório e após o protocolo de isolamento as bactérias foram avaliadas culturalmente e submetidas aos testes de: Tolerância ao baixo pH + Al^{3+} , diferentes meios salinos e solubilização do fosfato de cálcio *in vitro*. Em seguida foi realizado um experimento para a avaliação da eficiência simbiótica dos isolados, inoculados em *Vigna unguiculata* (L.) Walp. sob condições estériles em casa de vegetação. Após o isolamento e purificação dos isolados, o DNA bacteriano foi extraído e submetido à amplificação dos fragmentos dos genes simbióticos *nifH* e *nodC* para posterior avaliação da diversidade genética acessada por PCR-RFLP. Para tal, o gene 16S rRNA foi amplificado, empregando os iniciadores universais 27F (AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG) e 1492R (TACGGYTACCTTGT TACGACTT). As reações de restrição foram realizadas utilizando as endonucleases *HhaI*, *MspI* e *HinfI*. O produto da digestão foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose a 3%, em tampão TAE 1% por 80 min a 100 Volts. Para a quantificação dos Compostos Indólicos foi utilizado o método colorimétrico na avaliação das colônias crescidas com L-triptofano (3,5 mg) e sem L-triptofano em meio de cultura YM. Todos os isolados foram avaliados como bactérias acidificantes de crescimento rápido com principais características morfológicas de colônias irregulares com elevação umbiculada, superfície lisa e produção de exopolissacarídeos moderada. Os isolados DPBV41 e DPBV53 não tiveram crescimento visível, na placa de petri, quando submetidos a um pH 4,5 com e sem alumínio, caracterizando-se como isolados não tolerantes. Os isolados mais afetados pela variação do pH do meio de cultura e toxicidade por alumínio foram as bactérias isoladas da fabácea *Desmanthus pernambucanus*. As colônias de rizóbios que tiveram maiores probabilidades de tolerar os meios de cultura com alto teor de salinidade foram: MTBV77, MTP72, MTP37, DPBV42 e DPBV53 com crescimento máximo em todas as zonas de repicagem da placa de petri. Nas avaliações de amplificação simultânea dos

genes simbióticos, dentre os 80 isolados de rizóbios testados, 16 amplificaram apenas o gene *nifH* e cinco isolados amplificaram ambos os genes *nifH*+*nodC* simultaneamente. O padrão de bandejamento dos 21 isolados de rizóbios variou de acordo com cada enzima de restrição (*Hinf*I, *Hha*I e *Msp*I) e resultou em diferentes perfis de restrição transformados em dados binários e avaliados através de matriz de dissimilaridade genética pelo complemento do coeficiente de Jaccard. A partir da matriz de dissimilaridade foi construído um dendrograma pelo método de Ward, com o número de grupos definido pelo método de Mojena, resultando em IV grupos. Em média, a distância entre os pares de genótipos foi de 0,56. Destacaram-se como os pares mais divergentes os isolados DPP1 e MTP44, com distancia de 0,89 e os mais similares MTP72 e MTBV77 com distância de 0,10. A produção de Compostos Indólicos foi maior nas amostras onde houve acréscimo de L-triptofano, precursor do ácido-indol-acético, pelas bactérias MTBV12, MTBV77, MTP78 e MTP37. Os isolados de rizóbios nativos, avaliados nesse estudo, tem alta diversidade genética e se agrupam com base na planta isca da qual são isolados. A produção de Compostos indólicos é variável entre os isolados selecionados e é potencializada na presença do precursor L-Triptofano. Os isolados nativos de *Mimosa tenuiflora* são mais tolerantes ao estresse salino, acidez, e toxicidade por alumínio, em comparação as demais bactérias nativas isoladas de *Desmanthus perambucanus* e *Mimosa caesalpinifolia*. A maioria dos isolados de rizóbios nativos, avaliados tem baixa capacidade de solubilização do complexo fosfato de cálcio. Todas as bactérias isoladas foram capazes de nodular a espécie *Vigna unguiculata*.

Palavras-chave: Caatinga, Diversidade microbiana, Leguminosas nativas, Nitrogênio.

ISOLATED RHIZOBIA OF FABACEAE FORAGE OF SEMI-ÁRID: BIODIVERSITY AND SYMBIOTIC EFFICIENCY

GENERAL ABSTRACT

Biological nitrogen fixation is a natural process that occurs in associations of plants with diazotrophic bacteria. Most of the fodder fabaceae found in the Caatinga have high economic value and can be used to increase the nitrogen and organic matter input in the soil through biological nitrogen fixation and nutrient cycling. Thus the objective of this work was to characterize morphophysiological isolated of rhizobia native to the forage species *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung., *Mimosa caesalpinifolia* Benth. and *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir. To evaluate the resistance to saline stress, acidity, aluminum toxicity and solubilization capacity of calcium phosphate, as well as to test the symbiotic affectivity of the isolates. Authenticate the native rhizobia isolates through the simultaneous amplification of fragments of the *nifH* and *nodC* genes by means of the duplex PCR technique. To determine the genetic diversity of the isolates by the amplified ribosomal ADN restriction analysis (PCR-RFLP) technique using the *HhaI*, *MspI* and *HinfI* endonucleases and quantify the production of *in vitro* indole compounds. The soil used as substrate for the cultivation of the fabaceae was collected at specific points in the municipalities of Pocinhos, São Sebastião de Lagoa de Roça and Boa Vista in the state of Paraíba. The nodules were obtained from the cultivation of a bait plant in a greenhouse. Bacteria from the nodules were isolated and purified in the laboratory and after the isolation protocol the bacteria were culturally evaluated and submitted to the tests of: Tolerance to low pH + Al^{3+} , different saline media and solubilization of calcium phosphate *in vitro*. An experiment was then carried out to evaluate the symbiotic efficiency of the isolates inoculated in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. under sterile conditions in a greenhouse. After isolation and purification of the isolates, ADN was extracted and subjected to the amplification of the fragments of symbiotic genes *nifH* and *nodC* for further evaluation of the genetic diversity accessed by PCR-RFLP. For this, the 16S rRNA gene was amplified using the 27F universal primers (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) and 1492R (TACGGYTACCTTGT TACGACTT). Restriction reactions were performed using the *HhaI*, *MspI* and *HinfI* endonucleases. The digestion product was subjected to horizontal electrophoresis in 3% agarose gel in 1% TAE buffer for 80 min at 100 Volts. For the quantification of Indolic Compounds, the colorimetric method was used to evaluate the colonies added with L-tryptophan (3.5 mg) and without L-tryptophan in YM culture medium. All isolates were evaluated as fast growing acidifying bacteria with the main morphological characteristics of irregular colonies with umbiculate elevation, smooth surface and moderate exopolysaccharide production. The DPBV41 and DPBV53 isolates did not show visible growth in the petri dish when submitted to pH 4.5 with and without aluminum, characterizing as non-tolerant isolates. The isolates most affected by the pH variation of the culture medium and aluminum toxicity were the bacteria isolated from the *Desmanthus pernambucanus*. The rhizobia colonies that were most likely to tolerate high salinity culture media were: MTBV77, MTP72, MTP37, DPBV42 and DPBV53 with maximum growth in all of the petri dishes. In the simultaneous amplification evaluations of symbiotic genes, among the 80 rhizobia isolates tested, 16 amplified only the *nifH* gene and five isolates amplified both *nifH* + *nodC* genes simultaneously. The genetic variability of the 21 rhizobia isolates

varied according to each restriction enzyme (*Hinf*I, *Hha*I and *Msp*I) and resulted in different restriction profiles transformed into binary data and evaluated through genetic dissimilarity matrix by the complement of the Jaccard coefficient. From the dissimilarity matrix a dendrogram was constructed by the Ward method, with the number of groups defined by the Mojena method, resulting in IV groups. On average, the distance between pairs of genotypes was 0.56. The most divergent pairs were the DPP1 and MTP44 isolates, with a distance of 0.89 and the most similar MTP72 and MTBV77 with a distance of 0.10. The production of Indole Compounds was higher in the samples where there was an increase of L-tryptophan, precursor of indole-acetic acid, by bacteria MTBV12, MTBV77, MTP78 and MTP37. The isolates of native rhizobia have high genetic diversity and are grouped based on the bait plant from which they are isolated. The production of Indole Compounds is variable among the selected isolates and is potentiated in the presence of the L-Tryptophan precursor. The native isolates of *Mimosa tenuiflora* are more tolerant to saline stress, acidity, and aluminum toxicity compared to other native bacteria isolated from *Desmanthus pernambucanus* and *Mimosa caesalpinifolia*. Most of the native rhizobia isolates, evaluated in this work, have low solubilization capacity of the calcium phosphate complex. All the bacteria isolated were able to nodulate the species *Vigna unguiculata*.

Keywords: Caatinga, Microbial diversity, Native leguminosas, Nitrogen.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O solo é considerado um dos maiores reservatórios de biodiversidade microbiana, podendo existir milhares de diferentes espécies de bactérias por cm^3 de solo (Torsvik & Ovreas, 2002). Essa diversidade microbiana possui papel essencial para a dinâmica funcional do solo, como a decomposição da matéria orgânica, degradação de substâncias xenobióticas, controle biológico de patógenos, influência na solubilização de minerais e contribuição na estruturação e agregação do solo (Kujur et al., 2012). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo natural que ocorre em associações de plantas com bactérias diazotróficas do solo. Seu principal produto, o nitrogênio, é um nutriente essencial para o crescimento e o desenvolvimento vegetal.

A FBN é mediada por uma grande diversidade de microrganismos procariotos com amplos aspectos morfofisiológicos, genéticos, bioquímicos e filogenéticos. Essa biodiversidade garante a estabilidade e resiliência do ecossistema, pois, está ligada aos processos de formação do solo, ciclagem e armazenamento de nutrientes (Santos et al., 2007). A diversidade e o tamanho da comunidade rizobiana nativa no solo podem variar com a presença de fabáceas hospedeiras, também chamadas de leguminosas, de modo que a presença de uma determinada espécie de fabácea no solo pode resultar no desenvolvimento de uma comunidade simbiótica específica, e na ausência de uma planta hospedeira, os estresses ambientais, como os efeitos tóxicos relacionados à acidez do solo, podem diminuir significativamente a comunidade de rizóbios no local (Martins et al., 2011).

As fabáceas, através da FBN, desempenham um papel muito importante na agricultura sustentável devido a sua participação na nutrição e crescimento das plantas. As fabáceas fixadoras de nitrogênio representam uma alternativa ecológica e de baixo custo em relação aos fertilizantes nitrogenados, podendo ser empregadas na alimentação animal e recuperação de áreas degradadas, aumentando o aporte de nitrogênio (N) no solo (Efrose et al., 2018). O nitrogênio é o principal elemento limitante para a produtividade primária líquida em ecossistemas terrestres. A dinâmica da disponibilidade de N tem substancial impacto na estrutura, funções e processos do ecossistema. Além disso, a disponibilidade de N é crucial para determinar em longo prazo o sequestro de carbono terrestre (C) sob mudanças climáticas (Li et al., 2018).

Manter as altas produtividades é um fato inquestionável na agropecuária contemporânea, mas é necessário que essas atividades alterarem o mínimo possível à natureza. Uma maneira de diminuir o impacto ambiental negativo resultante do uso contínuo de fertilizantes químicos, herbicidas e pesticidas é o uso de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal, que colonizam a rizosfera das plantas, crescendo dentro ou ao redor dos tecidos vegetais estimulando o crescimento da planta por vários mecanismos (Pérez-montaña et al., 2014).

A diversidade microbiana do solo é um fator crucial para a saúde vegetal. Embora menos evidente, a diversidade microbiana é tão importante quanto à diversidade de plantas e animais. Quanto maior a variedade de microrganismos do solo, maior será a estabilidade do ecossistema e a eficiência do uso dos recursos disponíveis, pois menor será o gasto de energia para sustentar a biomassa presente.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar morfofisiologicamente isolados de rizóbios nativos das espécies forrageiras *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung., *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. e *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir. Avaliar a resistência ao estresse salino, acidez, toxicidade por alumínio e capacidade de solubilização do fosfato de cálcio, bem como testar a aficiencia simbiótica dos isolados (Capítulo II). Autenticar os isolados de rizóbios nativos através da amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* por meio da técnica duplex PCR. Determinar a diversidade genética dos isolados pela técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (PCR-RFLP) utilizando as endonucleases *HhaI*, *MspI* e *HinfI* e quantificar a produção de compostos indólicos *in vitro* (Capítulo III).

CAPÍTULO I
Referencial Teórico

1.1 Caracterização da Vegetação Caatinga

Na região Semiárida do Brasil, a vegetação predominante é a caatinga, (Sampaio, 2010), termo regional concedido a uma vegetação do tipo de florestas ou mata seca tropical decídua. Apesar da sua predominância essa vegetação não se apresenta uniformemente, pois a vegetação de Caatinga muda de acordo com os diferentes tipos de solos, clima e precipitação pluvial, pertinentes a cada região. Deste modo essa vegetação se apresenta na forma de mosaico, (Costa et al., 2007) e é tida como a principal base alimentar de grandes e principalmente de pequenos ruminantes (Sousa et al., 2011). Embora seja descrito por muitos autores que a vegetação da caatinga esteja alocada em áreas contínuas, não sugere que a vegetação seja homogênea, pois como supracitado as espécies botânicas que constituem tal vegetação têm diferentes mecanismos de adaptação aos fatores bióticos e abióticos presente em cada local.

As vegetações de caatingas apresentam peculiaridades e dinâmicas de crescimento diferentes de outros tipos de vegetação, pois o maior limitante de crescimento e desenvolvimento das plantas é a variabilidade espacial e temporal de chuvas que se apresenta como pulsos de precipitação pluvial no sistema. Uma vez que, a temperatura, radiação solar e aportes de nutrientes variam relativamente pouco durante o ano, nos ecossistemas do Semiárido, alterando-se apenas a precipitação pluvial que comumente ocorre em eventos descontínuos geralmente de curta duração ao longo do ano (Andrade et al., 2010).

1.2 Importância da Fixação Biológica de Nitrogênio para as Pastagens do Nordeste Brasileiro

O sistema agrícola mais frequentemente praticado no Nordeste do país está baseado na conversão de áreas nativas em áreas de cultivo, com corte e queima da vegetação nativa, plantio das culturas e subsequente abandono (pousio), antes de novo ciclo de derrubada e queima. A principal forma de entrada de N em ecossistemas naturais e em sistemas agrícolas de subsistência é a FBN. O alto custo do insumo e as incertezas climáticas, que prejudicam as respostas das culturas à sua aplicação, reduzem a viabilidade da aplicação de fertilizantes nitrogenados nesses sistemas (Freitas et al., 2015). Partindo desse princípio o cultivo de fabáceas com alto nível proteico e com potencial forrageiro é tido como alternativa viável para a maximização da produção

animal além de contribuir para o aumento do aporte de matéria orgânica do solo. Comumente as fabáceas são cultivadas com o propósito de adubação verde, contribuem significativamente para a melhoria das propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (Carvalho & Pires, 2008).

As fabáceas também podem ser usadas na recuperação de pastagens degradadas ou em processo de degradação. A melhoria das características químicas do solo acontece através da incorporação de nutrientes essenciais ao solo como o N, pela decomposição da serrapilheira depositada sobre ele. De acordo com Campos et al. (2006), existem muitos fatores que influenciam a decomposição da serrapilheira, incluindo a temperatura e umidade natureza dos organismos decompositores e a qualidade da serrapilheira. A relação C:N, o conteúdo de lignina, a relação lignina:N, o conteúdo de polifenóis, relação polifenóis:N, bem como as concentrações iniciais de N, Ca, Mg, K, P e S, que também, podem interferir nesse processo de mineralização dos resíduos vegetais. Ao estudarem a produção e qualidade da serrapilheira de três fabáceas arbóreas nativas do nordeste brasileiro Machado et al. (2012) observaram que a serrapilheira produzida pela *Samanea saman* (bordão de velho), *Parkia platycephala* (faveira) e *Caesalpineia ferrea* (pau ferro) aliadas aos teores de nitrogênio, fósforo e potássio encontrados, têm grande potencial em conservação de solo, considerando-se a inclusão dessas espécies em sistemas silvipastoris na região de estudo.

A liberação do nitrogênio adquirido pela fixação biológica será responsável, em grande parte, pela manutenção da produtividade do restante das plantas presentes na pastagem. As transferências do nitrogênio ocorrerão abaixo e acima da superfície do solo, diretamente ou indiretamente para a planta mais próxima, seja pela excreção de N na rizosfera da fabácea, pela decomposição de raízes e nódulos, pela conexão por micorrizas entre raízes da gramínea e fabáceas, ou ainda pela ação da fauna do solo sobre raízes e nódulos. Já na superfície do solo, ocorrerá pela decomposição da serrapilheira de folhas na superfície, pela lixiviação de compostos nitrogenados do dossel da pastagem e com as perdas foliares de amônia, passível de absorção pela gramínea. Há ainda a entrada do N pelas excretas (fezes e urina) dos animais em pastejo, que é a via mais rápida, em relação à decomposição da serrapilheira (Barcellos et al., 2008).

Em regiões áridas e semiáridas, as fabáceas que fixam nitrogênio frequentemente obtêm mais que a metade de seu N por meio da FBN, mas a quantidade fixada varia muito,

dependendo da especificidade da simbiose e das características ambientais, que afetam a produção de biomassa vegetal (Freitas et al., 2015). Geralmente, associada com altas temperaturas à umidade do solo está entre os fatores que acarretam limitações a FBN em regiões tropicais. A escassez de água provoca redução na abundância de microrganismos, pois além de fazer parte da estrutura celular é indispensável à maioria das reações químicas do solo, como a produção primária de energia, a decomposição da matéria orgânica, liberação de nutrientes, crescimento vegetal e a exsudação radicular (Zilli et al., 2013). As células em condições de estresse hídrico são também susceptíveis a danos químicos. Durante a desidratação podem sofrer desnaturação de proteínas e danos de ácido nucleico (Lebrazi & Benbrahim, 2014).

A fixação biológica do nitrogênio é indispensável para o sistema solo-planta-animal, sendo as leguminosas verdadeiras biofábricas consumidoras de energia limpa e renovável cuja linha de produção é de interesse para muitos sistemas de produção animal e vegetal. Em geral, nas fabáceas fixadoras de N, cerca de 75 % do N é oriundo da fixação biológica. Em particular, fabáceas forrageiras tropicais podem fixar de 2 a 183 kg/ha/ano de N, sendo que a FBN responde por 70 a 94 % do N existente na parte aérea (Barcellos et al., 2008). Por isso, há uma grande relevância na caracterização morfofisiológica de rizóbios nativos, pois é uma fonte de recursos genéticos para seleções de isolados adaptados às diversas variações edafoclimáticas (Medeiros et al., 2009).

Pelo seu valor econômico, as fabáceas forrageiras da caatinga (Lima et al., 2012), podem ser usadas para diversas funções como adubo verde, para o aumento da quantidade e qualidade da matéria orgânica do solo, alimentação animal como banco de proteínas em consórcio com gramíneas ou recuperação de áreas degradadas devido à fixação biológica de nitrogênio e ciclagem de nutrientes (Fontenele et al., 2009). Essas plantas são adaptadas às condições de altas temperaturas e distribuição irregular de chuvas, capazes de crescer e, potencialmente, fixarem nitrogênio com vantagem sobre outras espécies que não se adaptam ao clima da região. Porém, a vegetação da Caatinga ainda é pouco explorada, principalmente, em relação ao potencial produtivo das fabáceas.

1.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio é o processo pelo qual alguns microrganismos de vida livre, associativos ou simbióticos fixam o nitrogênio atmosférico. A partir do momento em que esses microrganismos interagem simbioticamente com hospedeiros

específicos, formando estruturas especializadas para fixar o nitrogênio, recebem o nome de microrganismos diazotróficos simbióticos, esses por sua vez, são agrupados em dois grupos principais de bactérias que não são relacionados filogeneticamente: Os rizóbios Alfa-proteobactérias, que se associam essencialmente com fabáceas pertencentes a uma superfamília de angiospermas, e Frankia Actinobactérias, que se associam a uma gama mais ampla de plantas (Frache et al., 2009).

A interação entre o microrganismo e a planta, início do processo de nodulação, começa com a liberação de compostos orgânicos no solo pelas raízes das plantas, entre eles estão os carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, aminoácidos e os derivados fenólicos como os flavonóides (Figura 1.1). Essas substâncias, quando em contato com os microrganismos presentes na rizosfera, ativam os genes de nodulação (Genes Nod) nas bactérias diazotróficas (Santos & Reis, 2008).

Após o processo de ativação dos genes Nod, inicia-se a síntese dos fatores de nodulação, que consiste na produção e liberação de exopolissacarídeos como, succinoglucanas, poliglucurananas e glucanas cíclicas na rizosfera, e têm como função principal a condução das bactérias até as raízes das plantas e a aderência dessas aos tricomas pela formação de um biofilme. Os exopolissacarídeos são mais investigados por apresentarem propriedades reológicas e farmacológicas diferenciadas e, consequentemente, despertam o interesse das indústrias alimentícia e farmacêutica (Monteiro et al., 2012).

Depois da formação de biofilme, garantia de aderência e interação física entre os simbiossistemas (Fernandes Júnior et al., 2010), as bactérias liberam novas substâncias e juntamente com o biofilme agem sob o fluxo de íons através das membranas plasmáticas das raízes, com subsequente despolarização associada a oscilações periódicas de cálcio intracelulares, esse processo garante o enovelamento do pelo radicular (Hirsch et al., 2001).

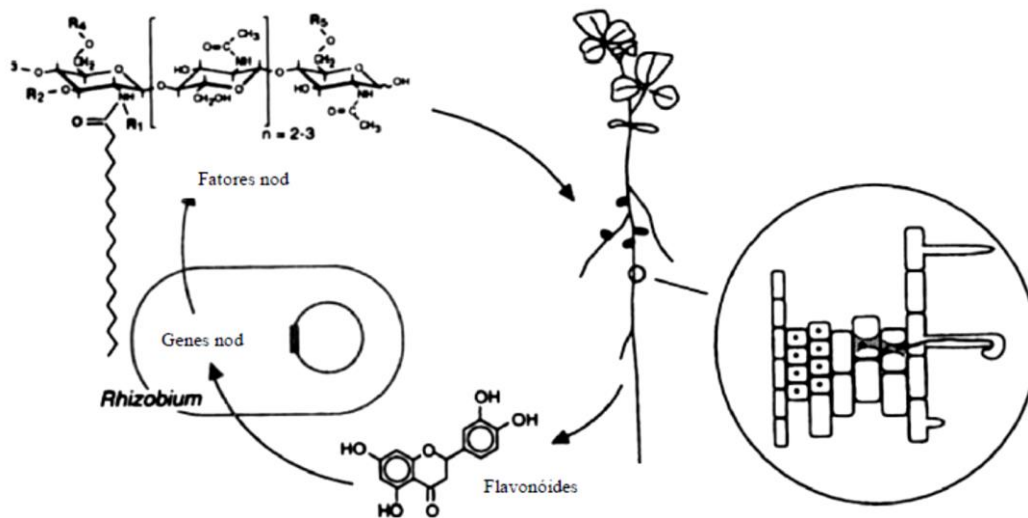
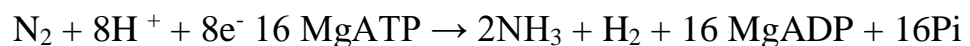


Figura 1.1. Troca de sinais no processo de simbiose entre Rhizobium-Planta. Flavonóides produzidos pela planta hospedeira induzindo genes Nod em rizóbios. Indução de produção de fatores Nod. Cordão de infecção no córtex da raiz (Franche et al., 2009).

Após o enovelamento dos pelos radiculares envolvendo grupos de bactérias, há uma degradação da parede celular do tricoma promovendo a entrada das bactérias nas raízes (infecção). Posteriormente, as bactérias formam um cordão de infecção, que cresce em direção às células da epiderme no córtex da raiz. No interior do cordão as bactérias se multiplicam e ao atingirem as células do córtex iniciam o primeiro nódulo (Fagan et al., 2007; Martins et al., 2010). Após alterações bioquímicas e fisiológicas, as bactérias passam a ser denominadas de bacterióides.

A nitrogenase presente nos bacterióides é a enzima responsável por reduzir o nitrogênio (N_2) a amônio (NH_4^+). É composta por dois metalocomponentes, a denitrogenase molibdênio-ferro-proteína (MoFe-proteína) e denitrogenase redutase Ferro-proteína (Fe-proteína). Para que ocorra a redução do N_2 a nitrogenase é auxiliada por outra molécula transportadora de elétrons a Ferridoxina. A estequiometria global de redução do gás nitrogênio é:



A Ferridoxina, na sua forma reduzida, transfere um elétron para a unidade Fe-proteína da nitrogenase, a Fe-proteína, então reduzida, doa o elétron recebido para a MoFe-proteína, que por sua vez acumula os elétrons. Após oito transferências, essa unidade terá acumulado oito elétrons e, então, fará a redução do N_2 à NH_4^+ . Para cada

elétron transferido da Fe-proteína para a MoFe-proteína são consumidos 2 ATPs. Para reduzir uma molécula de N_2 são necessários oito elétrons e, portanto, 16 ATPs (Cheng, 2008).

Como o NH_4^+ inibe a fixação e promove a dissociação entre a formação de ATP prejudicando o transporte de elétrons para a respiração e fotossíntese, essa substância é rapidamente exportada para o citosol das células, onde é assimilada através da glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT) e convertida à glutamina e glutamato. Em seguida, são incorporados com a asparagina e aspartato, sendo por fim, exportados como ureídeos para a utilização pela planta (Hungria & Kaschuk, 2014).

1.4 Histórico Taxonômico de Rizóbios

Os pesquisadores Hellriegel e Wilfarth (1888), no século XIX, foram os primeiros a estabelecer a presença de micróbios, no interior dos nódulos nas raízes das plantas, e inferiram ser esse o motivo da obtenção do nitrogênio do ar. Esses microrganismos foram isolados ainda em 1888 por Beijerinck, que os nomeou de *Bacillus radicícola*. Posteriormente, foram denominados *Rhizobium leguminosarum* por Frank (1889). Inicialmente, os pesquisadores consideraram o rizóbio como espécie única, capaz de nodular todas as leguminosas (Vieira, 2007).

Logo após, a classificação foi baseada na especificidade hospedeira. De acordo com essa classificação, havia apenas um gênero, *Rhizobium*, dentro do qual foram reconhecidas seis espécies, *Rhizobium leguminosarum* (nodula *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* e *Lens*), *R. trifolii* (*Trifolium*), *R. phaseoli* (*Phaseolus*); *R. meliloti* (*Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*), *R. japonicum* (*Glycine max*) e *R. lupini* (*Lupinus*). Com o prosseguimento dos estudos, tornou-se claro que os rizóbios eram um grupo de bactérias bastante diverso, tanto em círculo de hospedeiros como em características fisiológicas, e que havia algum tipo de correlação entre essas duas propriedades (Stralio, 2015). Löhnis e Hansen (1921) sugeriram a divisão dos rizóbios de acordo com a taxa de crescimento das bactérias. Em 1982, Jodan reclassificou algumas espécies, separando-as com base no crescimento, em meio de cultura, em dois grupos: as de crescimento rápido foram agrupadas no gênero *Rhizobium* e as de crescimento lento no gênero *Bradyrhizobium*.

O tempo de crescimento em meio de cultura é, até o presente, uma característica importante na diferenciação preliminar dessas bactérias. Inicialmente, considerava-se

rizóbio de crescimento rápido as espécies que demoravam de 2 a 3 dias para apresentar colônias isoladas nesse meio de cultura, e, acima disto, eram consideradas de crescimento lento. Atualmente, existem as espécies que apresentam crescimento intermediário (4 a 5 dias) e as de crescimento muito lento, que demoram mais de 10 dias para que se possa observar o aparecimento de colônias (Melloni et al. 2006; Stralioetto, 2015). Para classificar as diversas espécies de rizóbios, foram, tradicionalmente, utilizados testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e simbióticos, que além da taxa de crescimento em meio de cultura levavam em conta a habilidade em utilizar fontes de carbono e de nodular leguminosas hospedeiras, dentre outros (Chueire et al., 2003).

As técnicas moleculares há algum tempo fazem parte dos estudos taxonômicos, competitividade e ecologia de rizóbios. Como resultados dessas técnicas, os rizóbios que antes eram classificados apenas em dois gêneros e seis espécies passaram a ser definidos em seis gêneros (*Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*) e 30 espécies (Chueire et al., 2000). A análise filogenética e sequenciamento do gene 16S rRNA foram propostos como ferramentas necessárias para a identificação das bactérias fixadoras de nitrogênio. Além disso, a similaridade da cepa poderia ser facilmente avaliada usando a técnica de “impressão digital” de DNA REP PCR (Shamseldin et al., 2016).

Segundo Shamseldin et al. (2016), atualmente, as bactérias nodulíferas das fabáceas, pertencem a duas grandes classes bacterianas diferentes; as proteases α e β proteobactérias (Figura 1.2). A classe maior, as alfa proteobactérias são compostas por seis famílias, incluindo Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae, Hyphomicrobiaceae, Methylobacteriaceae e Brucellaceae. A segunda classe é composta pelas beta proteobactérias, atualmente contém uma família de Burkholderiales que contém dois gêneros.

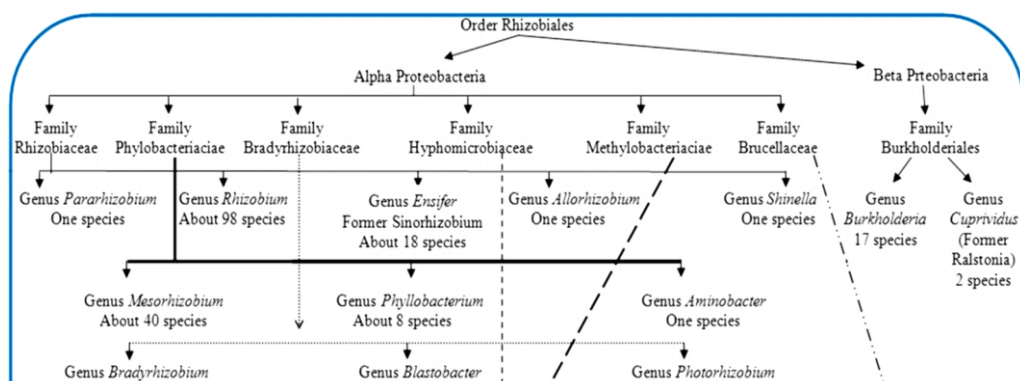


Figura 1.2. Diagrama esquemático para explicar o número e distribuição de espécies bacterianas nodulantes de leguminosas nas classes de Proteobactérias α e β . Fonte: (Shamseldin et al., 2016).

1.5 Genes Nif e Nod em Bactérias: Diversidade, Funções e Utilização para fins Taxonômicos

O solo é um ambiente diverso e consegue abrigar representantes de todos os grupos conhecidos de microrganismos, tais como bactérias, actinomicetos, fungos, algas e protozoários. A biodiversidade do solo tem um papel fundamental na regulação dos processos biogeoquímicos formadores e mantenedores dos ecossistemas.

No que se refere à diversidade genética e metabólica dos microrganismos, que tem sido explorada há muitos anos visando à obtenção de produtos biotecnológicos, tais como a produção de antibióticos, alimentos, ácidos orgânicos, tratamento e/ou remediação de resíduos, na agricultura e fertilização de solos, destacamos a incrível versatilidade metabólica das bactérias justificando a sua ocorrência em diferentes ambientes e condições de sobrevivência.

A FBN processo natural pelo qual o nitrogênio atmosférico N_2 entra no ecossistema, mediado por bactérias diazotróficas, é uma tecnologia importantíssima para aumentar o aporte de N no solo (Dias et al., 2012). O nitrogênio é considerado elemento essencial para as plantas, pois está presente na composição das mais importantes biomoléculas, tais como ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas e inúmeras enzimas (Bredemeier & Mundstock, 2000). Em muitos sistemas de produção, a disponibilidade de nitrogênio é quase sempre um fator limitante, influenciando o crescimento da planta mais do que qualquer outro nutriente. A FBN é um processo complexo que requer a expressão de

genes específicos, alguns deles são denominados genes *nod* responsáveis no processo de interação e sinalização entre macro e micro simbioses, bem como na formação dos nódulos. Outro conjunto de genes importantíssimos são os *nif* (“nitrogen fixation”), os quais codificam para a formação de proteínas envolvidas diretamente no processo de fixação do nitrogênio (Teixeira, 1997).

1.5.1 Genes Nod

O processo de Fixação Biológica de Nitrogênio inicia-se com a sinalização entre macro (Fabácea) e microssimbionte (Bactéria diazotrófica simbiótica). Essa interação acontece por gradientes químicos liberados por ambas as partes. Em bactérias do gênero *Rhizobium*, o plasmídeo *Sym* contém a maioria dos genes responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio. Esse plasmídeo contém um operon de três genes, *nod ABC*, cuja expressão é regulada pelo gene *nodD* induzido por flavonoides. As expressões desses genes guiam o desenvolvimento nodular e permitem que a infecção prossiga, além de estarem envolvidos na determinação da especificidade do hospedeiro (Person, 2015). A interação que ocorre entre plantas e rizóbios, no processo de infecção, é conhecida pela cascata de reações químicas, que se inicia quando a planta exsuda flavonóides no meio, percebidos pelo rizóbio, induzem-no a ativar os genes *nod*, sendo responsável pela codificação das moléculas responsáveis pela biossíntese dos fatores *nod*, que são exopoligossacarídeos. Estes exopoligossacarídeos são sinais para as plantas, que, na sua presença, ativam genes para a codificação de proteínas responsáveis pelo processo de nodulação (Hoffmann, 2007).

As proteínas regulatórias *nodD* agem como sensores ambientais e ativadores da transcrição dos genes de nodulação (*nod*, *nol* e *noe*), resultando na produção e liberação dos fatores de nodulação, que afetam profundamente as raízes das leguminosas, permitindo que a nodulação ocorra (Sena, 2013). A produção dos fatores *Nod* começa pela síntese do esqueleto principal, constituído por 3-5 N-acetilglucosamina e 1-4 β -glucosamina, codificadas pelos genes de nodulação denominados “genes comuns” como os *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodM*, *nodN*, essenciais à síntese da estrutura básica da molécula sinal (Figura 1.3). Posteriormente, esta estrutura basal é modificada tanto em seu extremo redutor como em seu extremo não redutor, mediante várias proteínas codificadas pelos genes de nodulação conhecidos como “genes específicos” (Grange, 2005).

De acordo com Roche et al. (1996), os genes reguladores *nodD* codificam proteínas que ligadas ao DNA ativam a transcrição dos outros operons *nod*. Esses genes determinam um primeiro nível de especificidade do hospedeiro, uma vez que as proteínas *nodD* são ativadas por sinais emitidos pelas raízes das plantas cuja natureza e abundância podem variar de acordo com o hospedeiro. Os genes estruturais *nod* compreendem genes que são espécie-específica e genes comuns a todas as espécies de rizóbios.

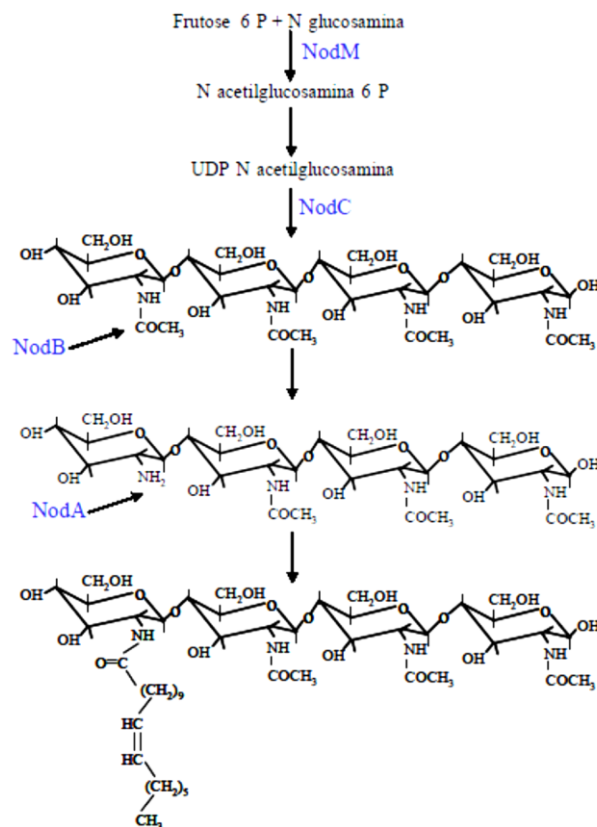


Figura 1.3. Rota biossintética da estrutura básica de um fator de nodulação. Fonte: (Grange, 2005).

Os genes específicos de *nod* são os principais determinantes da especificidade do hospedeiro, sendo cada espécie de *Rhizobium* caracterizada por uma determinada combinação de genes específicos.

A origem dos genes *Nod* é um enigma e sua função é incomum. Uma visão alternativa é que os genes-chave de nodulação podem ter sido adquiridos a partir de fungos. A maioria dos fungos sintetiza quitina como parte da sua parede celular, que são semelhantes aos genes *nodC* (Hirsch et al. 2001). Segundo Sena (2013), as modificações

do esqueleto de quitina dos genes *nod* (Quadro 1.1), conferem especificidade para a nodulação de um determinado hospedeiro.

Quadro 1.1 Mutações na estrutura básica do gene *nod*

Gene	Variações na estrutura dos fatores Nod
<i>nodEF</i>	saturações e insaturações de ácidos graxos
<i>nodZ, nolK, noeC</i>	fucosilação
<i>nodH e noeE</i>	sulfatação
<i>nodL, nodX, nolL</i>	acetilação

Essas variações na estrutura dos fatores Nod podem surgir por vários motivos. As modificações e a diversidade das estruturas dos fatores Nod produzidas pelos rizóbios resulta da presença combinada de genes espécie-específicos e da variação alélica dos genes de nodulação. Dessa forma, uma determinada espécie de rizóbio irá produzir uma mistura de fatores de nodulação (de 2 a 60 moléculas distintas). Mutações nos genes *nod* específicos não impedem a nodulação, mas podem causar atrasos na formação ou redução do número de nódulos e diminuir a gama de hospedeiros.

1.5.2 Genes *nif*

Os genes *nif* (Nitrogen fixation) estão diretamente envolvidos no processo de fixação biológica de nitrogênio. A descoberta desses genes foi proveniente do estudo genético da fixação do nitrogênio por *Klebsiella pneumoniae*, foram identificados 20 genes, organizados entre 7-9 operons que ocupam no genoma de *K. pneumoniae* uma região de aproximadamente 24 kb entre os genes *shiA* e *hisD*. Os genes *nifHDK* codificam as proteínas estruturais do complexo enzimático denominado nitrogenase I, este complexo é caracterizado pela presença de duas metalo-proteínas, a MoFe-proteína (ou componente I) e a Fe-proteína (ou componente II) (Teixeira, 1997).

Na natureza existem outros sistemas de enzimas capazes de fixar nitrogênio atmosférico, nos quais, aparentemente, o molibdênio é substituído por vanádio ou ferro (Hoffmann, 2007). Contrariando as considerações históricas sobre a importância essencial do molibdênio para o funcionamento da nitrogenase, ainda na década de 80 descobriu-se que várias classes de bactérias são capazes de fixar nitrogênio em condições de deficiência de molibdênio, utilizando sistemas enzimáticos alternativos, como a nitrogenase de vanádio e ferro (nitrogenase VFe), ou a que contém apenas ferro como metal de transição (nitrogenase Fe) (Nunes et al., 2003).

Os genes que codificam as proteínas para a nitrogenase II (ou V-dependente) são denominados de *vnf* e no caso da nitrogenase III (Fe-dependente ou nitrogenase alternativa) de *anf*. A expressão de cada nitrogenase é controlada pela disponibilidade dos metais no ambiente. Quando molibdênio está presente, somente a nitrogenase I (Mo-dependente) é sintetizada. Na falta deste e na presença de vanádio, observa-se a expressão da nitrogenase II (V-dependente). Quando ambos (Mo e V) estão ausentes, apenas a nitrogenase III (nitrogenase alternativa ou Fe-dependente) é expressa (Alves et al., 2004). Além dos genes estruturais, outros genes *nif* (Quadro 1.2) estão envolvidos com a síntese e processamento do cofator de FeMo (FeMo-Co) e geração de energia para a nitrogenase.

A nitrogenase alternativa dependente de vanádio é composta por duas subunidades alfa (VnfD), duas subunidades beta (VnfK) e quatro subunidades delta (VnfG), formando uma enzima heterooctomérica com dois cofatores de ferro e vanádio (Fe-V). Como a *NifH*, a *VnfH*, em conjunto com a ferredoxina, transfere elétrons para a dinitrogenase. A V-nitrogenase apresenta diferente especificidade de substratos, sendo incapaz de reduzir acetileno em etileno, além de ser relativamente menos eficiente que a Mo-nitrogenase na redução de nitrogênio atmosférico. Essa enzima produz uma quantidade maior de hidrogênio, por causa dessa ineficiência da V-nitrogenase em reduzir N_2 e da elevada capacidade de produzir hidrogênio (Souza, 2015).

O outro complexo enzimático possui apenas ferro e é codificado pelos genes *anfHDGK*. Essa terceira nitrogenase não contém molibdênio ou vanádio e o átomo heterometal no cofator é o ferro. Esta enzima é conhecida como nitrogenase-3 ou nitrogenase dependente de ferro (Fenitrogenase) (Souza, 2015). Um quarto tipo de nitrogenase foi recentemente caracterizado na bactéria termofílica *Streptomyces thermoautotrophicus*, cuja propriedade mais notável é a dependência de oxigênio e do radical superóxido, ambos nocivos para a maioria das nitrogenases (Nunes et al., 2003).

Quadro 1.2. Produtos codificados pelos genes *nif* e suas respectivas funções na FBN

GENE	PRODUTO	FUNÇÃO
<i>NifH</i>	Codifica para Fe-proteína ou componente II da Nitrogenase	Transferência de elétrons para a MoFe-proteína, participa na biossíntese e

		inserção do FeMo-Co
<i>NifDK</i>	Codifica para subunidade α e β da MoFe-proteína ou componente I da nitrogenase	Redução do N_2 a NH_4^+ , quando associada com a Fe-proteína
<i>NifA</i>	NifA	Regula positivamente a transcrição dos genes <i>nif</i>
<i>NifL</i>	NifL, modulador negativo da proteína NifA em <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Azotobacter vinelandii</i>	Modula negativamente a atividade da proteína NifA
<i>NifNE</i>	$\alpha_2 \beta_2$ tetramero semelhante a FeMo-proteína, FeS-proteína sensível ao oxigênio.	Essencial para a biossíntese do FeMo-Co
<i>NifB</i>	FeS-proteína, sensível ao oxigênio e associada a membrana em <i>K. pneumoniae</i>	Participa na biossíntese do FeMo-Co
<i>NifQ</i>	não determinado	Não é essencial em concentrações normais de Molibdênio, deve desempenhar papel no metabolismo do Mo tornando-o disponível para incorporação ao FeMo-Co
<i>NifV</i>	Homocitrato-sintase	Sintetiza homocitrato, essencial para a estabilização do FeMo-Co
<i>NifM</i>	NifM	Participa no processamento da Fe-proteína
<i>NifX</i>	não determinado	Evidência do seu envolvimento no processo de regulação negativa da transcrição dos genes <i>nif</i>
<i>NifU</i>	não determinado	Desconhecida
<i>NifS</i>	S-transferase cisteína dependente (cisteína desulfurase)	Promove a dessulfidação de cisteína dependente de piridoxal fosfato. Deve participar como doador de S para vários grupamentos FeS da Nitrogenase
<i>NifJ</i>	Piruvato:Flavodoxina-oxidoreductase, proteína dimérica (α_2) que contém centros FeS	Doa elétrons para a Flavodoxina
<i>NifF</i>	Flavodoxina	Doa elétrons para a Fe-proteína
<i>NifY</i>	Codifica para subunidade γ_2 presente na apo-FeMo-proteína	Participa na de inserção do FeMo-Co. Pode estar envolvido com a síntese, inserção e/ou isomerização do grupamento Fe_4S_4
<i>nifW nifZ nifT</i>	não determinados	Desconhecidas, podem estar envolvidos com o processo de maturação.

Fonte: Teixeira (1997).

1.6 Utilização de genes específicos para fins Taxonômicos

O papel da comunidade microbiana não é atuar apenas na recuperação de solos agrícolas, degradados ou em processo de degradação, mas é indispensável para preservação e estabilidade do ecossistema, com associações simbióticas, controle biológico de patógenos, solubilização de minerais e estruturação e agregação do solo. De

forma geral, microrganismos desempenham função crucial na transformação de energia e em processos biogeoquímicos. Por isso, estudos que permitam o isolamento, a identificação e a quantificação desses organismos nos vários habitats são de grande valor.

Segundo Grange (2005), a identificação rápida e confiável de estirpes bacterianas continua sendo o objetivo mais importante nos estudos taxonômicos. O agrupamento dos rizóbios foi inicialmente baseado em características fenotípicas, principalmente na habilidade de nodular algumas leguminosas, dando origem ao conceito de “grupos de inoculação cruzada”. A taxonomia do rizóbio, baseada na especificidade hospedeira, foi sendo substituída pela taxonomia numérica, que se apoia nas características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares. Atualmente são as análises genotípicas que direcionam os estudos taxonômicos e compreendem todas as metodologias direcionadas ao estudo das moléculas de DNA ou RNA. Através da aplicação de tecnologias baseadas em PCR, sequenciamento automatizado, eletroforese de campo pulsado e RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) é possível gerar dados de alta qualidade que podem ser usados para melhorar os sistemas existentes de identificação e classificação microbiana; permitir a rápida detecção, identificação de organismos novos; determinar condições ecológicas para o isolamento seletivo; determinar a extensão da diversidade procariótica, inclusive determinando a distribuição geográfica de microrganismos de importância industrial e/ou agrônoma.

Os avanços nas técnicas moleculares ao longo dos últimos anos resultaram no desenvolvimento de ferramentas avançadas para aplicação em estudos relacionados à diversidade genética e taxonomia microbiana. Segundo Peix et al. (2015), na década de 1970, estudos apontavam que a capacidade de induzir a formação de nódulos era devido a genes específicos, (Genes *nod* e *nif*), contidos nos plasmídeos dos rizóbios de crescimento rápido. Na década de 2000 foi descoberto que estes genes são abrigados em ilhas simbióticas na maioria dos rizóbios de crescimento intermediário e lento. Em todos os casos, os genes de nodulação são submetidos à transferência lateral de genes. Embora elementos genéticos móveis sejam ferramentas inadequadas para delimitação taxonômica de espécies bacterianas, as características simbióticas eram utilizadas na classificação taxonomia de rizóbios.

Na atualidade a maioria dos estudos taxonômicos, de grupos microbianos, são baseados em um gene, é comumente realizado com base em sequências dos *operons*

ribossomais, usualmente o gene 16S rRNA é mais recomendado no estudo com bactérias (Berrada & Fikri-Benbrahim, 2014). De acordo com Durrer & Andreote (2016), para obter informações correlacionadas com funções desempenhadas por grupos microbianos nos solos, outros genes são utilizados, com destaque para os genes relacionados com etapas específicas dentro dos ciclos biogeoquímicos. Dentre estes, os genes mais utilizados são aqueles relacionados à ciclagem de nitrogênio como o *nif* – responsável pela fixação biológica de nitrogênio e *nod* – indução a nodulação de plantas (estabelecimento da simbiose). Apesar da avalanche de dados genotípicos na literatura, a correlação destes com as características fenotípicas é uma das condições para a descrição de novos gêneros e espécies bacterianas. Além disso, estas análises de agrupamento facilitam os estudos comparativos do comportamento dos diferentes grupos, tanto intraespecíficos como interespecíficos, quanto à diferentes características a nível de campo (Grange, 2005).

Corroborando com as afirmações supracitadas Berrada & Fikri-Benbrahim (2014), relatam que o sequenciamento do gene 16S rRNA é a principal ferramenta no estudo da filogenia microbiana. Outros genes envolvidos na simbiose das leguminosas denominados genes "auxiliares" ou "acessórios" são comumente incluídos na descrição das espécies de rizóbios e em outras análises, entre eles os mais estudados são: *nodD*, *NodA*, *nodC* e *nifH*, porém são geralmente codificados em plasmídeos. E segundo os autores esses genes não são úteis na taxonomia rizobiana devido à sua capacidade de transferência horizontal para outras bactérias. A perda ou ganho de material genético faz parte da evolução do genoma microbiano. Parte da informação genética é essencial para os genomas, mas alguns genes podem ser intercambiados, perdido ou ganho por transferência horizontal. O genoma de base está limitado a genes que codificam para as funções básicas, tais como a tradução, transcrição, regulação e metabolismo primário. Em contraste, a maior parte do material é transferida horizontalmente a partir de um pacote genético flexível (Lloret & Martinez-Romero et al 2005).

Os genes simbióticos são utilizados em alguns métodos moleculares, baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), empregados para análise da variação genética dentro de espécies de rizóbio. O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA (RFLP) usado em conjunto com uma variedade de sondas de DNA tem sido comumente utilizado para avaliar a diversidade genética, a variação

genética dentro de espécie e para inferir sobre a estrutura das populações de rizóbio no solo. Análises dos padrões de bandas produzidas pelo PCR-RFLP do gene 16S rRNA ou genes simbióticos (*nod* e *nif*) são utilizadas para distinguir rizóbios em nível de espécie e para inferir sobre relacionamentos filogenéticos (Vieira, 2007).

Em ecossistemas áridos e semiáridos é necessário que existam bons planejamentos de produção, com práticas sustentáveis, capazes de desenvolver e satisfazer as necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras de satisfazerem as suas próprias necessidades. Todavia, a exploração de recursos naturais em áreas de vegetação de Caatingas preservando sua sustentabilidade é um grande desafio, tendo em vista que, as grandes limitações ocorrem devido à falta de capacitação e investimento no pequeno produtor.

Práticas simples como conservação de forragem, enriquecimento da pastagem e conhecimento da capacidade de suporte das pastagens, sendo estes manejos diretamente afetados pelo dinamismo do acúmulo de fitomassa, pode mudar a estrutura do cenário atual e está diretamente interligada às condições edafoclimáticas da região.

A fixação biológica do nitrogênio, conforme discutido anteriormente, constitui-se a fonte mais importante de entrada de N nas pastagens nordestinas, possibilitando incrementar e disponibilizar o N no sistema solo-planta-animal. Dessa forma, além de todos os benefícios provenientes da FBN, reduziriam a emissão de gases causadores do efeito estufa por unidade produzida.

BIBLIOGRAFIA

ALVES, G. C.; SILVA, M. F.; FONSECA, W. C.; TEIXEIRA, K. R. S. **Procedimentos para isolamento de bactérias que expressam sistemas alternativos de nitrogenases: preparo de vidraria e meios de cultura**. Comunicado Técnico-Embrapa. 2004.

ANDRADE, A. P; COSTA, R. G.; SANTOS E. M. Produção animal no semiárido: o desafio de disponibilizar forragem, em quantidade e com qualidade, na estação seca. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.4, n.4, p.1-14, 2010.

BARCELLOS, A. O.; RAMOS, A. K. B.; VILELA L.; MARTHA JUNIOR, G. B. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego

de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, p.51-67, 2008.

BEIJERINCK, M.W. Die Bacterien der Papilionaceen-knöllchen. **Botanische Zeitung**. v.46, p. 797-804, 1888.

BERRADA H.; FIKRI-BENBRAHIM, K. Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. **British Microbiology Research Journal**. v.4, n.6, p. 616-639, 2014.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**. v.30, n.2, p.365-372, 2000.

CAMPOS, M. L.; MARCHI, G.; LIMA, D. M.; SILVA, C. A. S. **Ciclagem de nutrientes em florestas e pastagens**. Lavras: UFLA, s.d. 61 p. 2006.

CARVALHO, G. G. P; PIRES, A. J. V. Leguminosas tropicais herbáceas em associação com pastagens. **Archivos de Zootecnia**. v.57, p.103-113, 2008.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.27, p.833-840, 2003.

CHUEIRE, L. M. O.; FERREIRA, E. B. M. C.; GRANGE, L.; CAMPO, R. J.; MOSTASSO, F. L.; ANDRADE, D. S.; FEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. **Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas de soja e do feijoeiro**. Embrapa Soja – Boletim de pesquisa III. 2000, 32p.

COSTA, R. C.; ARAÚJO, F. S.; LIMA-VERDE, L. W. Flora and life-form spectrum in an area of deciduous thorn woodland (caatinga) in northeastern, Brazil. **Journal of Arid Environments**. v.68, p.237-247, 2007. doi:10.1016/j.jaridenv.2006.06.003

DIAS, A. C. F.; SILVA, M. C. P.; COTTA, S. R.; DINI-ANDREOTE, F.; SOARES JR, F. L.; SALLES, J. F.; AZEVEDO, J. L.; ELSAS, J. D.; ANDREOTE, F. D. Abundance and genetic diversity of nifH gene sequences in anthropogenically affected Brazilian mangrove sediments. **Applied and Environmental Microbiology**. 2012, doi:10.1128/AEM.02273-12

EFROSE, R. C.; ROSU, C. M.; STEDEL, C.; STEFAN, A.; SIRBU, C.; GORGAN, L. D.; LABROU, N. E; FLEMETAKIS, E. Molecular diversity and phylogeny of indigenous Rhizobium leguminosarum strains associated with Trifolium repens plants in Romania. **Springer**. 2018. DOI 10.1007/s10482-017-0934-3

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A. et al. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja – Revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia Uruguaiana**, v.14, n.1, p.89-106, 2007.

FERNANDES JÚNIOR P. I.; ALMEIDA, J. P. S.; PASSOS S. R. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.12, p.1465-1471, 2010.

FONTENELE, A. C. F.; ARAGÃO, W. M.; RANGEL, J. H. A. Leguminosas tropicais: *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. uma forrageira promissora. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.15, p.121-123, 2009.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant Soil**, v.321, p.35-59, 2009. doi 10.1007/s11104-008-9833-8

FRANK, B. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v.7, p.332-346, 1889.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; SILVA, A. F.; SOUZA, R. J. C. Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**. v.8, p.585-597, 2015.

GRANGE, L. **A análise polifásica na reclassificação filogenética de *rhizobium etli* e o estudo da diversidade genética de isolados dos cerrados brasileiros**. 2005. 152 p. tese (Doutorado em Genética) Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

HELLRIEGEL, H., WILFARTH, H. Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. **Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins Rübenzucker-industrie deutschen Reiches**, p.1- 234, 1888.

HIRSCH, A. M.; LUM, M. R.; DOWNIE, J. A. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? **Plant Physiology**. v.127, p.1484-1492, 2001.

HOFFMANN, L. V. Biologia Molecular da Fixação Biológica do Nitrogênio. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 312 p.

HUNGRIA, M. AND KASCHUK, G. Regulation of N₂ Fixation and Assimilation in Nodulated and N-Fertilized *Phaseolus vulgaris* L. Exposed to High-Temperature Stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.98, p.32-39, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.10.010>

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov. a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.32, p. 136-139, 1982.

KUJUR, M.; GARTIA, S. K.; PATEL, A. K. Quantifying the contribution of different soil properties on enzyme activities in dry tropical ecosystems. **ARPN Journal of Agricultural and Biological Science**. v.7, p.763-772, 2012

LEBRAZI SF, BENBRAHIM K. Environmental stress conditions affecting the N₂ fixing *Rhizobium*-legume symbiosis and adaptation mechanisms. **African Journal of Microbiology Research**, v.8, n.53, p.4053-4061, 2014.

LI, D.; ZHANG, Q.; XIAO, K.; WANG, Z.; WANG, K. Divergent responses of biological nitrogen fixation in soil, litter and moss to temperature and moisture in a karst forest, southwest China. **Soil Biology and Biochemistry**. v.118, p.1-7, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.11.026>

LIMA, A. A.; FERNANDES JÚNIOR P. I.; PASSOS S. R. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de mucuna-cinza e mucuna-anã. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.36. p.337-348, 2012.

LÖHNIS, F.; HANSEN, R. Nodule bacteria of leguminous plants. **Journal of Agricultural Research**, v.20, p.543-556, 1921.

MACHADO, F. A.; BEZERRA NETO, E.; NASCIMENTO, M. P. S. C. B. Produção e qualidade da serrapilheira de três leguminosas arbóreas nativas do nordeste do Brasil. **Archivos de Zootecnia**. v.61, n.235, p.323-334, 2012.

MARTINS, A. F.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SAMPAIO, J. A.T.; ARAÚJO, J. H. B.; TURCATEL, A.T.; DIEMER, G. D.; SÁ, E. L. S. Diversidade genética, tolerância aos fatores de acidez e eficiência simbiótica de rizóbios para Cornichão de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. v.35, p.1855-1864, 2011.

MARTINS, A.F.; VARGAS, L.K.; ZANIN, J.G. Resistência à salinidade de rizóbios noduladores de *Lotus* spp. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.16, n.1, p.73-79, 2010.

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, n.3, p.529-535, 2009. doi: 10.4025/actasciagron.v31i3.793.

MELLONI R. MOREIRA F. M. S, NÓBREGA R. S. A, SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.30, p.235-246, 2006.

MONTEIRO, N. K.; ARANDA-SELVERIO, G.; EXPOSTI, D. T. D. et al. Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. **Química Nova**, v.35, n.4, p.705-708, 2012.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p.872-879, 2003.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. Bacterial Associations with Legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.34, n.3, p.17-42, DOI: 10.1080/07352689.2014.897899.

PÉREZ-MONTAÑO, F.; ALÍAS-VILLEGAS, C.; BELLOGÍN, R.A.; CERRO, P.; ESPUNY, M.R.; JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; LÓPEZ-BAENA, F.J.; OLLERO, F.J.; CUBO B. T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**. v.169, p.325–336, 2014.

PERSSON, T.; BATTENBERG, K.; DEMINA, I. V.; VIGIL-STENMAN, T.; HEUVEL, B. V.; PUJIC, P.; FACCIOTTI, M. T.; WILBANKS E. G.; O'BRIEN, A.; FOURNIER, P.; HERNANDEZ, M. A. C., HERRERA, A. M.; MÉDIGUE, C.; NORMAND, P.;

PAWLOWSKI, K.; BERRY, A. M. Candidatus rankia Datiscae Dg1, the Actinobacterial Microsymbiont of Datisca glomerata, Expresses the Canonical nod Genes nodABC in Symbiosis with Its Host Plant. **PLOS ONE**. v.10, n.5, p.1-33, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0127630

ROCHE, P.; MAILLET, F.; PLAZANET, C.; DEBELLE, F.; FERRO, M.; TRUCHET, G.; PROMET, J.C.; NARIE, J. The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.93, p.15305–15310, 1996.

SAMPAIO, E. V. S. B. Caracterização do Bioma Caatinga. In: GARIGLIO, M. A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; CESTARO, L. A.; KAGEYAMA, P. Y. **Uso Sustentável e Conservação dos Recursos Florestais da Caatinga**. Serviço Florestal Brasileiro, 2010. p.30-49.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M. **A formação de nódulos em leguminosas**. Seropédica. Embrapa Agrobiologia. Documentos/ Embrapa Agrobiologia, p.14, 2008.

SENA, J. **Análise da função dos ativadores transcricionais syrm1 e syrm2 de rhizobium sp. Ngr234 no processo de nodulação**. 2013. 106f. Dissertação (Mestrado em Genética), Ciências Biológicas/Universidade Federal do Paraná, Paraná.

SHAMSELDIN, A.; ABDELKHALEK, A.; SADOWSKY, M. J. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. **Symbiosis-Springer**. 2016. DOI 10.1007/s13199-016-0462-3

SOUSA, J. E. L.; DAMASCENO, M. I. F.; SANTOS, M. N. F. **Manejo sustentável da caatinga no sertão central cearense**. Resumos do VII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Fortaleza/CE. p. 5. 2011.

SOUZA, B. C. E. **Mapeamento de agrupamentos gênicos envolvidos na fixação biológica de nitrogênio em genomas de isolados brasileiros de cianobactérias**. 2015. 101 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. ESALQ/USP.

SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**. v.38, n.4, p.401-419, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>

STRALIOTTO, R. **Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares no Estudo da Biodiversidade do Rizóbio**. Embrapa. p. 42, 2006.

STRALIOTTO, R. **Diversidade do Rizóbio – Evolução dos Estudos Taxonômicos**. Embrapa. p.37, 2015.

TEIXEIRA, K. R. S. **Bases moleculares e genética da fixação de nitrogênio**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 26p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 32).

TORSVIK, V.; OVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**. v.5, p.240–245, 2002.

VIEIRA, R. F. Diversidade e Taxonomia de Rizóbio. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 312 p.

VIEIRA, R. F.; Diversidade e Taxonomia de Rizóbio. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 312 p.

ZILLI, J. E.; PEREIRA, G. M. D.; FRANÇA JÚNIOR, I. Dinâmica de rizóbios em solo do cerrado de Roraima durante o período de estiagem. **Acta Amazônica**, v.43, n.2, p.153–160, 2013.

CAPÍTULO II

ATRIBUTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS NATIVOS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO

ATRIBUTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS NATIVOS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO

Resumo: É inquestionável a importância das fabáceas para a sustentabilidade da vegetação caatinga, sobretudo pelo alto grau de endemismo. No entanto, o conhecimento das características morfológicas e tolerância, das espécies bacterianas nativas, frente aos estresses abióticos ainda são incipientes. Neste contexto, objetivou-se caracterizar morfofisiologicamente isolados de rizóbios nativos das espécies forrageiras *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung., *Mimosa caesalpinifolia* Benth. e *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir, avaliar a tolerância dos isolados ao estresse salino, acidez e toxicidade por alumínio. Obter a capacidade de solubilização do fosfato de cálcio, bem como testar a eficiência simbiótica dos isolados. O solo usado como substrato, foi coletado em pontos específicos dos municípios de Boa Vista, São Sebastião de Lagoa de Roça e Pocinhos no estado da Paraíba. Os nódulos foram obtidos do cultivo de planta isca em casa de

vegetação. As bactérias, provenientes dos nódulos, foram isoladas e purificadas em laboratório. Após o protocolo de isolamento as bactérias foram avaliadas culturalmente e submetidas a testes de tolerância. Em seguida foi realizado um experimento para a avaliação da eficiência simbiótica dos isolados, inoculados em *Vigna unguiculata* (L.) Walp. sob condições estériles em casa de vegetação. Todos os isolados foram avaliados como bactérias acidificantes de crescimento rápido com principais características morfológicas de colônias irregulares com elevação umbiculada, superfície lisa e produção de exopolissacarídeos moderada. Os isolados DPBV41 e DPBV53 não tiveram crescimento visível, na placa de petri, quando submetidos a um pH 4,5 (sem alumínio) e ao pH 4,5 com Alumínio, caracterizando-se como isolados não tolerantes. Os isolados mais afetados pela variação do pH do meio de cultura e toxicidade por alumínio foram as bactérias isoladas da fabácea *Desmanthus pernambucanus*. As colônias de rizóbios que tiveram maiores probabilidades de tolerar os meios de cultura com alto teor de salinidade foram: MTBV77, MTP72, MTP37, DPBV42 e DPBV53 com crescimento máximo em todas as zonas de repicagem da placa de petri. Os isolados nativos de *Mimosa tenuiflora* são mais tolerantes ao estresse salino, acidez, e toxicidade por alumínio, em comparação as demais bactérias nativas isoladas de *Desmanthus pernambucanus* e *Mimosa caesalpinifolia*. A maioria dos isolados de rizóbios nativos, avaliados neste trabalho, tem baixa capacidade de solubilização do complexo fosfato de cálcio. Todas as bactérias isoladas foram capazes de nodular a espécie *Vigna unguiculata*.

Palavras-chave: Caatinga, Bactérias diazotróficas, Diversidade microbiana, fabáceas nativas.

MORPHOPHYSIOLOGICAL ATTRIBUTES OF ISOLATED NATIVE RHIZOBIA OF SEMI-ARID PARAIBANO

Abstract: The importance of the fabaceae for the sustainability of the caatinga vegetation is unquestionable, mainly due to the high degree of endemism. However, the knowledge of the morphological characteristics and behavior of the native bacterial species in relation to the abiotic extremes are still incipient. In this context, we aimed to characterize morphophysiological isolates of rhizobia native to forage species *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung., *Mimosa caesalpinifolia* Benth. and *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir, to evaluate the tolerance of the isolates to salt stress, acidity and aluminum toxicity. Obtain the ability to solubilize calcium phosphate as well as test the symbiotic efficiency of the isolates. The soil used as a substrate was collected at specific points in the municipalities of Pocinhos, São Sebastião de Lagoa de Roça and Boa Vista in the state of Paraíba. The nodules were obtained from the cultivation of a bait plant in a greenhouse. Bacteria from the nodules were isolated and purified in the laboratory. After the isolation protocol, the bacteria were culturally evaluated and submitted to tolerance tests. An

experiment was then carried out to evaluate the symbiotic efficiency of the isolates inoculated in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. under sterile conditions under greenhouse conditions. All isolates were evaluated as fast growing acidifying bacteria with the main morphological characteristics of irregular colonies with umbiculate elevation, smooth surface and moderate exopolysaccharide production. The isolates DPBV41 and DPBV53 did not show visible growth in the petri dish when submitted to pH 4.5 (without aluminum) and at pH 4.5 + Aluminum, characterizing as non-tolerant isolates. The isolates most affected by the pH variation of the culture medium and aluminum toxicity were the bacteria isolated from the Fabbrica *Desmanthus pernambucanus*. The rhizobia colonies that were most likely to tolerate high salinity culture media were: MTBV77, MTP72, MTP37, DPBV42 and DPBV53 with maximum growth in all of the petri dishes. The native *Mimosa tenuiflora* isolates are more tolerant to salt stress, acidity, and aluminum toxicity compared to other native bacteria isolated from *Desmanthus pernambucanus* and *Mimosa caesalpinifolia*. Most of the native rhizobia isolates, evaluated in this work, have low solubilization capacity of the calcium phosphate complex. All the bacteria isolated were able to nodulate the species *Vigna unguiculata*.

Keyword: Caatinga, Diazotrophic bacteria, Microbial diversity, native fabaceae.

2.1 Introdução

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) constitui-se a fonte mais importante de entrada de nitrogênio (N) nas pastagens, possibilitando incrementar e disponibilizar o N no sistema solo-planta-animal. Dessa forma além de todos os benefícios provenientes da FBN como recuperação de pastagens degradadas, melhoria da gestão empregada à vegetação nativa, enriquecimento de pastagens cultivadas e sistemas agrosilvipastoris, a FBN promove maior sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola, através da redução de gases causadores do efeito estufa por unidade produzida (Barcellos et al., 2008).

A fixação biológica de nitrogênio é o segundo processo biológico, depois da fotossíntese, mais importante para as plantas e fundamental para a vida na Terra, mediada por uma grande diversidade de microrganismos. Essa biodiversidade garante a estabilidade e resiliência do ecossistema, pois, está ligada aos processos de formação do solo, ciclagem e armazenamento de nutrientes (Santos et al., 2007). A grande diversidade de microrganismos e evolução no campo da sistemática bacteriana levou a contínuas modificações na taxonomia de rizóbios, passando por revisões periódicas à medida que os estudos ecológicos mostram a ocorrência significativa de novos grupos de bactérias. Com o desenvolvimento dos estudos taxonômicos, é importante correlacioná-los com características fenotípicas das estirpes selecionadas (Stralioto, 2006). O tempo de crescimento em meio de cultura é, até o presente, uma característica importante na diferenciação preliminar dessas bactérias, assim como as características culturais das colônias e a produção de exopolissacarídeos (Melloni et al., 2006; Straliotto, 2015).

A caracterização de rizóbios nativos eficientes na fixação biológica de nitrogênio, adaptados ao clima semiárido, e a diversos outros fatores como variações no pH, solos salinos e altas temperaturas, é indispensável para comunidade científica desenvolver novos inoculantes, mais eficientes e resistentes aos estresses edafoclimáticos dessa região. As características morfofisiológicas contribuem também para o entendimento de processos adaptativos das bactérias ao meio ambiente. Uma possível domesticação dessas estirpes pode ser a “chave” para a melhoria da oferta de forragem para ruminantes, sendo essa de boa qualidade.

Neste contexto, objetivou-se caracterizar morfofisiologicamente isolados de rizóbios nativos das espécies forrageiras *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung., *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. e *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir, avaliar a resistência ao

estresse salino, acidez, toxicidade por alumínio e capacidade de solubilização do fosfato de cálcio, bem como testar a eficiência simbiótica dos isolados.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Procedimento da coleta do solo

Para o cultivo das fabáceas o solo foi coletado em três locais distintos da Paraíba, nos municípios de Boa Vista ($7^{\circ}16'31.0''\text{S}$ $36^{\circ}16'25.5''\text{W}$), Pocinhos ($7^{\circ}02'57.5''\text{S}$ $35^{\circ}59'00.2''\text{W}$) e São Sebastião de Lagoa de Roça ($7^{\circ}03'45.1''\text{S}$ $35^{\circ}50'32.6''\text{W}$), em áreas de caatinga (Figura 2.1). Foram realizadas dez coletas aleatórias na área, coletando-se solo rizosférico, das espécies em estudo, e não rizosférico em pontos equidistantes no mínimo de 10 m entre si, a uma profundidade de 0-20 cm. Foi feita uma amostra composta dos solos coletados em cada uma das áreas. As amostras foram levadas ao laboratório em caixas térmicas. Em seguida foram destorroados, homogeneizados e passados em peneiras com crivo de 2,0 mm e destinadas ao plantio das fabáceas *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung., *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. e *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir. conhecida popularmente como Jureminha, Sabiá e Jurema preta, respectivamente. Os testes seguiram o protocolo operacional, para o isolamento de rizóbios a partir de nódulos de planta-isca (Xavier et al., 1997).

Foram destinadas amostras do solo coletado em cada um dos municípios supracitados pra as análises química e física do solo, realizadas no laboratório de Química de Fertilidade do Solo da Universidade Federal da Paraíba (Tabelas 2.1 e 2.2).

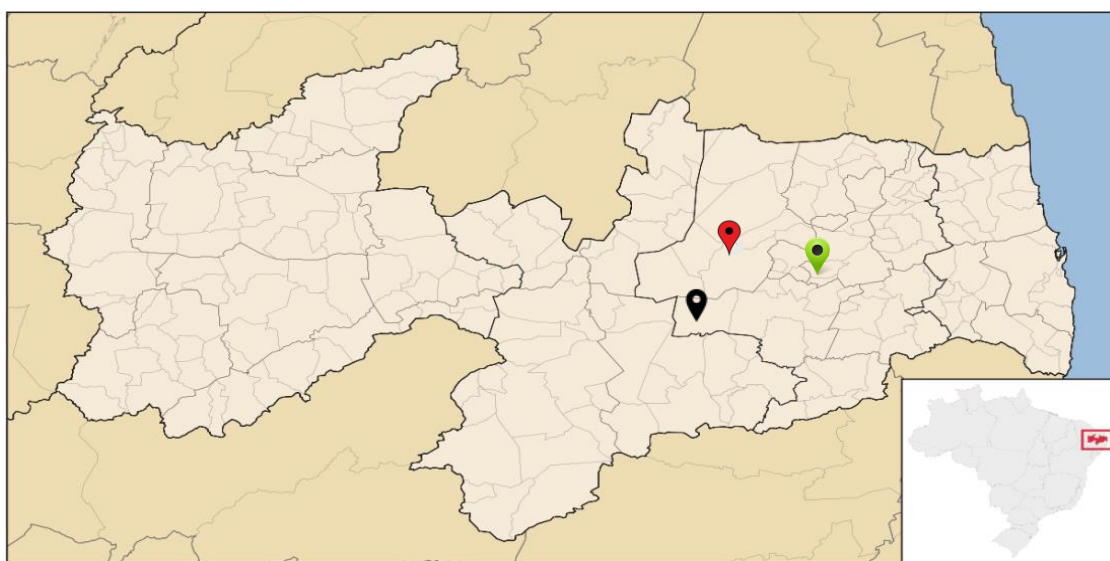


Figura 2.1. Indicação das áreas de coleta dos solos. 📍Boa Vista, 📍Pocinhos e 📍São Sebastião de Lagoa de Roça – Paraíba.

Tabela 2.1. Análise química do solo coletado em pontos específicos dos municípios de Boa Vista, Pocinhos e São Sebastião de Lagoa de Roça - Paraíba.

Amostra	pH	P	K ⁺	Na ⁺	H ⁺ + Al ⁺³	Al ⁺³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	SB	CTC	M.O
	água (1:2,5)		-----cmol _c /dm ³ -----								g/kg
Boa Vista	6,1	13,13	76,09	0,29	1,32	0	2,23	1,63	4,34	5,66	15,08
Pocinhos	4,4	4,99	47,65	0,09	2,72	0,25	0,18	0,40	0,79	3,52	13,51
L. de Roça	5,4	4,85	100,01	0,04	2,72	0,05	0,49	0,31	1,1	3,82	16,34

SB = Soma de bases; CTC = Capacidade de troca catiônica; MO = Matéria orgânica.

Tabela 2.2. Análise física do solo coletado em pontos específicos dos municípios de Boa Vista, Pocinhos e São Sebastião de Lagoa de Roça, Paraíba.

Amostra	Areia	Silte	Argila	Classe textural
	2-0,05mm	0,05-0,002mm	<0,002mm	
Boa Vista	589	233	178	Franco arenosa
Pocinhos	864	79	57	Areia franca
L. de Roça	822	95	83	Areia franca

Para a obtenção dos isolados de rizóbios foi montado um ensaio em casa de vegetação usando Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Foram usados vasos de polipropileno com capacidade de 1,5 kg, que foram devidamente esterilizados antes do plantio. Anteriormente ao plantio das fabáceas foi feita a superação da dormência das sementes, por meio da imersão destas em água quente (90 °C) durante 30 segundos, subsequentemente, em água na temperatura ambiente por um minuto (Bakke et al., 2006). Posteriormente, foram desinfestadas superficialmente, por 2 minutos, com álcool etílico a 70% e hipoclorito de sódio a 2%, por 3 minutos e semeadas, três sementes por vaso (Figura 2.2). Após a emergência das plântulas foi efetuada o raleio, sendo utilizada apenas uma planta por vaso para a obtenção dos nódulos radiculares. As plantas foram regadas com água destilada conforme necessário e colhidas 90 dias após a emergência.



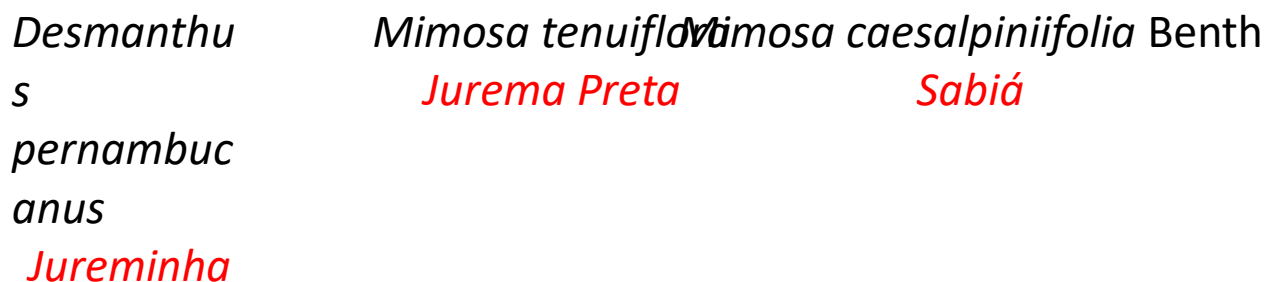


Figura 2.2. Amostra das sementes utilizadas no experimento.

Ao término do experimento, as raízes foram coletadas e lavadas, secas em papel toalha e fragmentadas em pedaços menores com auxílio de uma tesoura. Os nódulos radiculares foram retirados e preservados em recipientes hermeticamente fechados contendo algodão e sílica perolada.

2.2.2 Isolamento e purificação

A desinfestação dos nódulos seguiu a metodologia proposta por Hungria & Araujo (1994), que consiste no tratamento dos nódulos com solução de álcool etílico a 70% por um minuto, para quebra da tensão superficial e remoção de bolhas de ar no tecido, e com solução de hipoclorito de sódio a 1% por dois minutos, para desinfestação superficial. Em seguida, foram lavados com água destilada e esterilizada (ADE). Posteriormente, os nódulos foram macerados com bastão de vidro esterilizado e inoculados em placas de Peri contendo meio de cultura YMA (Yester Manitol Agar) (Vincent, 1970) com a adição de 5,0 mL L⁻¹ de vermelho Congo. O material amostrado foi incubado em câmara DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) a 28 °C por 10 dias. Após o período de incubação e crescimento bacteriano, as colônias foram purificadas e classificadas quanto ao tempo de crescimento conforme Melloni et al. (2006). As características morfológicas das colônias foram determinadas juntamente com o tempo de crescimento segundo Hungria e Silva (2011). Após três dias de incubação, o diâmetro das colônias foi medido com auxílio de um contador de colônias, sendo o tamanho determinado em milímetros.

Quanto à forma das colônias, foram classificadas como puntiforme, circular ou irregular. A elevação foi considerada como lenticular, convexa e umbiculada. A superfície foi classificada em lisa, rugosa ou papilada (Figura 2.3).

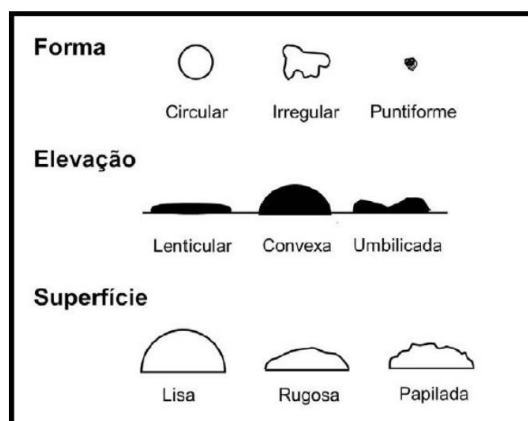


Figura 2.3. Morfologia de colônias de bactérias utilizadas na caracterização cultural em meio de cultura. Fonte: Adaptado de Hungria e Silva (2011).

A produção de exopolissacarídeos foi determinada visualmente em escassa, moderada e abundante (Melloni et al., 2006). A classificação fisiológica, modificação do pH do meio de cultura, foi avaliada pelo aspecto colorimétrico com a inoculação das bactérias em meio de cultura YMA modificado pela adição 10 mL L⁻¹ de azul de bromotimol (Vincent, 1970). Os isolados de rizóbios acidificantes tornam o meio amarelo, enquanto que os alcalinizantes tornam o meio verde azulado e os neutros não modificam a coloração do meio de cultura variando entre o bege, branco e transparente.

2.2.3 Teste de tolerância à salinidade

A análise de tolerância de rizóbios em meio salino foi testada pela confecção do meio de cultura YMA com diferentes águas salinas, retiradas de dois poços artesianos distintos localizados no município de Pocinhos-PB, denominadas nesse trabalho como Águas A e B (tabela 2.3).

Tabela 2.3. Análise de água de poços artesianos usados para confecção do meio YMA usados como teste de tolerância à salinidade.

Variável	pH	C.E	SO ₄ ⁻²	MG ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	CO ₃ ⁻²	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	RAS	PST	Classificação
		dS m ⁻¹ 25°C	-mgL ⁻¹										
Água A	6,2	18,0	65,2	15,9	104,9	1,2	9,8	0	3,5	215,2	29,2	29,5	C4S4
Água B	6,5	14,2	8,5	15,7	61,4	0,9	12,2	0	5,2	434,5	16,4	18,4	C4S4

RAS= Razão de adsorção de sódio; PST= Porcentagem de sódio trocável. C4S4= (risco de salinidade muito alto e de sodicidade muito alto)

Foram utilizadas duas placas de petri, com divisória simples, para cada isolado de rizóbio, somando um total de quatro repetições por isolado (Figura 1). As avaliações foram feitas no terceiro dia de incubação e fornecidos escores para avaliar o crescimento

de cada isolado, segundo uma escala pré-estabelecida, variando de zero, sem crescimento visível na placa, a quatro, crescimento em todas as zonas, segundo Hara & Oliveira (2004).

2.2.4 Teste de tolerância à acidez e ao alumínio

Para a avaliação da tolerância à acidez e ao alumínio, os isolados foram transferidos para o meio YMA, com pH 6,5 (controle); pH 6,5 + 2,0 cmol_c Al L⁻¹; pH 4,5; e pH 4,5 + 2,0 cmol_c Al L⁻¹. O alumínio foi adicionado na forma de AlCl₃. Foram utilizadas quatro repetições para cada meio com base no método de repicagem recomendado por Hara & Oliveira (2004) (Figura 2.4), utilizando duas placas com divisória simples onde cada lado da placa continha uma repetição.

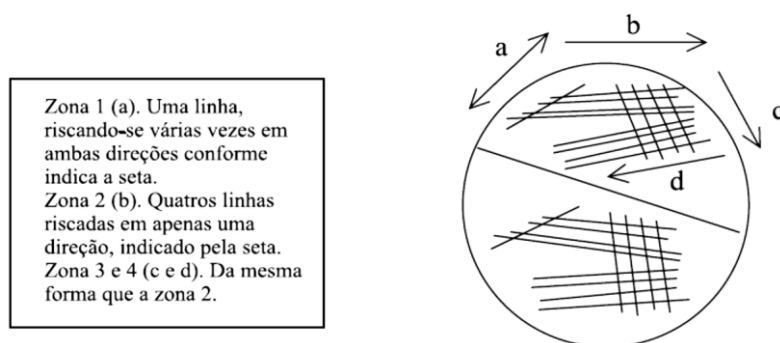


Figura 2.4. Ilustração do método de repicagem de bactéria para avaliação da tolerância à salinidade, acidez e ao alumínio, segundo Hara & Oliveira (2004).

As avaliações foram feitas no terceiro dia de incubação e fornecidos escores para o crescimento de cada isolado, segundo uma escala pré-estabelecida (Figura 2.5), variando de zero, sem crescimento visível na placa, a quatro, crescimento em todas as zonas (Hara & Oliveira, 2004). Os isolados foram classificados como: sensíveis, medianamente tolerantes e tolerantes (Tabela 2.4).

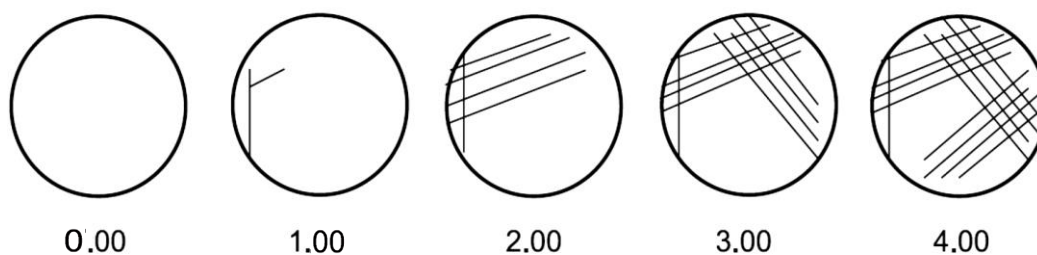


Figura 2.5. Escala para avaliação da tolerância à salinidade, acidez e alumínio de isolados de rizóbio distribuídos em meio de cultura, segundo Hara & Oliveira (2004).

Tabela 2.4. Escala para a avaliação do crescimento de rizóbios no meio YMA resistentes à salinidade e acidez + alumínio (pH 6,5; pH 6,5+Al; pH 4,5+Al; pH 4,5).

Graus de tolerância	Intervalos de pontuação
Sensível	1,00 – 2,00
Mediana	2,00 – 3,00
Tolerante	3,00 – 4,00

Fonte: Hara & Oliveira (2004).

2.2.5 Teste de solubilização de fosfato de cálcio

A análise de solubilização de fosfato de cálcio pelos rizóbios, foi feita em meio GL desenvolvido por Sylvester-Bradley et al. (1982), contendo 10g de glicose, 2g de extrato de levedura e 18g de Agar L⁻¹. Foram acrescentadas as soluções, I (5% de KH₂PO₄) e II (10% de CaCl₂), para a formação do fosfato de cálcio precipitado. Em seguida, ajustou-se o pH do meio de cultura para 6,5. Os isolados de rizóbios, previamente crescidos em meio YMA foram repicados para o meio GL, com o auxílio de uma alça de platina, retirando-se uma porção do isolado armazenado, e encostando a alça de platina no meio de cultura, formando um ponto, para cada colônia. Os testes foram realizados em triplicata, com duas repetições por placa. A capacidade de solubilização pôde ser identificada através da presença de um halo translúcido ao redor da colônia avaliada. As medidas foram feitas a cada três dias durante 18 dias. Com base nos índices de solubilização, (IS) = diâmetro do halo/diâmetro da colônia, os isolados foram classificados como bactérias com baixa (IS<2), média (2< IS < 2) e alta (IS>4) capacidade de solubilização do fosfato de cálcio.

2.2.6 Eficiência simbiótica das bactérias inoculadas em Feijão-Macassa

Para avaliar a capacidade simbiótica das bactérias, foi montado um experimento em condições estéreis. Os isolados de rizóbios foram avaliados quanto à capacidade de nodulação da espécie vegetal *Vigna unguiculata* (L.) Walp. popularmente conhecida como feijão-caupi ou feijão-macassa. O experimento foi instalado em casa de vegetação pertencente ao laboratório de sementes CCA/UFPB. O plantio do feijão-macassa ocorreu em vasos de polipropileno com capacidade para 500 mL, esterelizados e preenchidos com areia lavada e autoclavada. Foram avaliados os isolados de Jurema preta, Jureminha e Sabiá, previamente selecionados pelos testes de tolerância, adicionaram-se quatro

sementes por vaso, e o raleio feito aos 15 dias após a emergência das plântulas deixando apenas uma planta por vaso.

Para o preparo do inoculante, os isolados foram crescidos em meio LM (Levedura e Manitol), corado com azul de bromotimol, em erlenmeyer contendo 50 mL de meio. As bactérias foram cultivadas durante três dias e a inoculação feita em duas etapas. Na primeira etapa, a inoculação foi realizada diretamente no vaso no ato do plantio, sendo 1,5 mL de cultivo de bactéria por semente, e na segunda etapa, foi realizada uma nova inoculação aos corridos quinze dias após a primeira inoculação, desta vez, superficialmente, com 5 mL de cultivo por vaso. As plantas receberam solução nutritiva de Norris e Date (1976) ½ força, sendo aplicados 5 mL por planta uma vez por semana. Foi adotado o sistema de auto irrigação com água destilada e esterelizada. Para esse processo os vasos contendo as plantas ficaram suspensos em astes de madeira sob outros vasos contendo água, ambos ligados por um cordão de algodão devidamente esterelizado. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições e dois vasos controle sem inoculação.

As plantas foram colhidas após um período de 40 dias. Foi feita a contagem dos nódulos e segmentação das plantas em parte aérea e raiz, cada uma das partes (nódulos, parte aérea e raiz) foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa de circulação forçada de ar a 65° C até peso constate, para avaliação da massa seca. Após o período de secagem foi feita a pesagem em balança analítica. As amostras foram analisadas segundo as variáveis: massa seca da parte aérea, massa seca da raiz, número de nódulos e massa seca dos nódulos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o pacote estatístico SAS.

Os atributos morfológicos dos isolados de rizóbios foram transformados em matriz binária e analisado pela Distância Binária de Sokal expresso da seguinte forma:

$$\sqrt{[(b+c)/(a+b+c+d)]^{1/2}} \text{ intervalo } 0-1$$

Onde: a= 1-1 b= 1-0 c= 0-1 d= 0-0

Para a análise de agrupamento, foi utilizado o método da variância mínima de Ward (1963), com o número de grupos definido pelo método de Mojena (1977). A medida de dissimilaridade adotada foi a distância Euclidiana quadrática, sendo a distância Euclidiana originalmente a base para o método de Ward.

Os resultados dos testes de tolerância foram analisados através do Modelo de Regressão Censurada, logt cumulativo utilizando o Programa R Studio 3.3.

$$y_i^* = x_i' \beta + \varepsilon_i$$

$$y_i = \begin{cases} a & \text{if } y_i^* \leq a \\ y_i^* & \text{if } a < y_i^* < b \\ b & \text{if } y_i^* \geq b \end{cases}$$

Onde:

a, é o limite inferior da variável dependente;

b, é o limite superior da variável dependente;

Se $a = -\infty$ ou $b = \infty$, a variável dependente não é censurada à esquerda ou censurada à direita, respectivamente.

2.3 Resultados e discussão

Foram selecionados e purificados 21 isolados de rizóbios e identificados como: MCLR34, DPP1, DPP41, DPP45, DPBV53, DPBV42, MTP5, MTPR35, MTP62, MTP38, MTP68, MTP78, MTP23, MTP21, MTBV46, MTBV77, MTBV12, MTP25, MTP72, MTP37, MTP44. Onde, as duas primeiras letras, da sigla de identificação dos rizóbios, correspondem ao gênero e epíteto específico da planta isca da qual foram retirados os nódulos, seguidas da letra que corresponde ao local de coleta do solo. Assim, DP correspondente à *Desmanthus pernambucanus*, MC à *Mimosa caesalpiniiifolia* e MT à *Mimosa tenuiflora*, e BV, LR, e P correspondem respectivamente à Boa Vista, Lagoa de Roça, e Pocinhos – Paraíba.

Todos os isolados cresceram em até três dias em câmara de crescimento DBO a 28 °C e acidificaram o pH do meio de cultura, deixando-o na cor amarela. As características morfológicas que prevaleceram entre os isolados foram: Formada da colônia irregular, elevação umbiculada, superfície lisa e produção de exopolissacarídeos moderada (Figura 2.6).

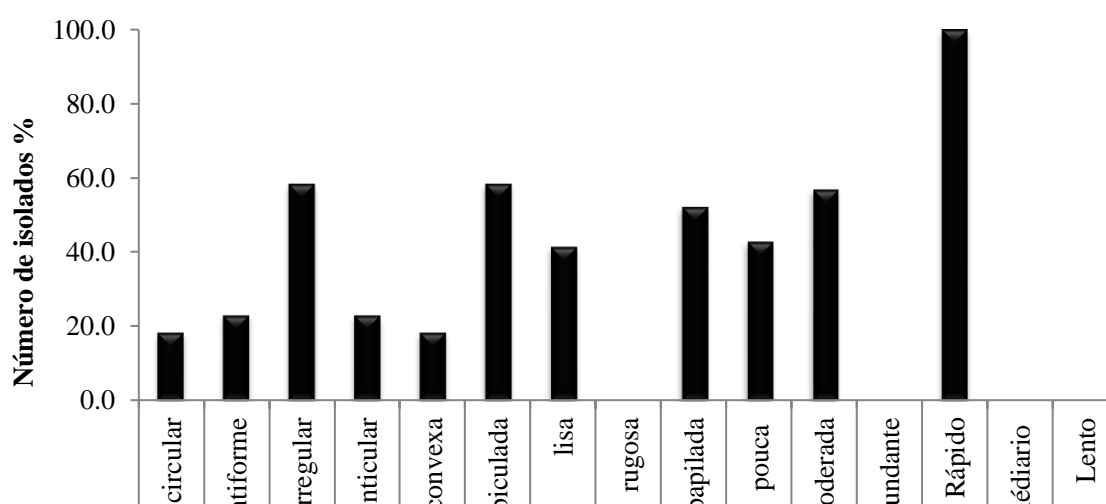


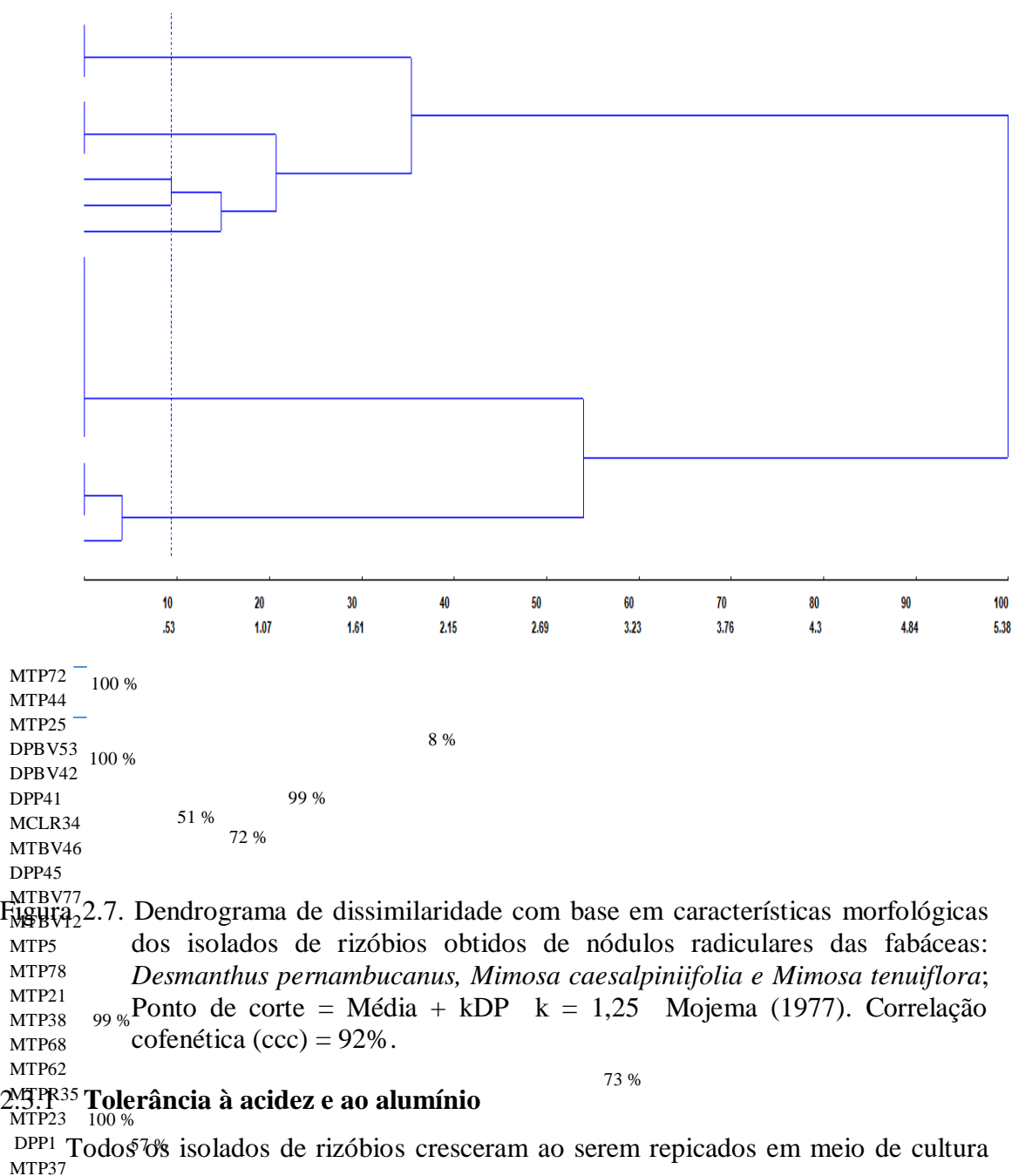
Figura 2.6. Distribuição dos Isolados de rizóbios obtidos de nódulos radiculares das fabáceas: *Desmanthus pernambucanus*, *Mimosa caesalpiniiifolia* e *Mimosa tenuiflora*, quanto às características morfológicas. (EPS = Exopolissacarídeos).

As características fisiológicas, tempo de crescimento e mudança de pH do meio de cultura, encontradas neste trabalho corroboram com os resultados encontrados por Kapembwa et al., (2016), ao caracterizarem morfológicamente rizóbios nativos da Zâmbia, África oriental, encontraram bactérias de crescimento rápido e que acidificaram o meio de cultura, segundo os autores as alterações de pH no meio de cultura, geradas por rizóbios, é devido à utilização preferencial de açúcares por estirpes de crescimento rápido, e/ou pela excreção de ácidos orgânicos e compostos azotados no meio de cultura. Bactérias nodulíferas de crescimento rápido são comumente encontradas em regiões Semiáridas (Freitas et al., 2007).

A propriedade de rápido crescimento constitui um dos mecanismos de sobrevivência desses microrganismos, pois, a tolerância a ambientes semiáridos se deve a rápida multiplicação em curto espaço de tempo, diminuindo assim o espaço entre as gerações. Deste modo, o tempo de crescimento parece estar associado às condições ambientais como disponibilidade de água, temperatura, pH e fertilidade do solo. Neste estudo não houve colônias secas, apesar de 43% das bactérias apresentarem pouco muco. Segundo Medeiros et al. (2009), a produção de muco pode representar um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência bacteriana, quando submetidas a condições desfavoráveis ao seu crescimento e estabelecimento.

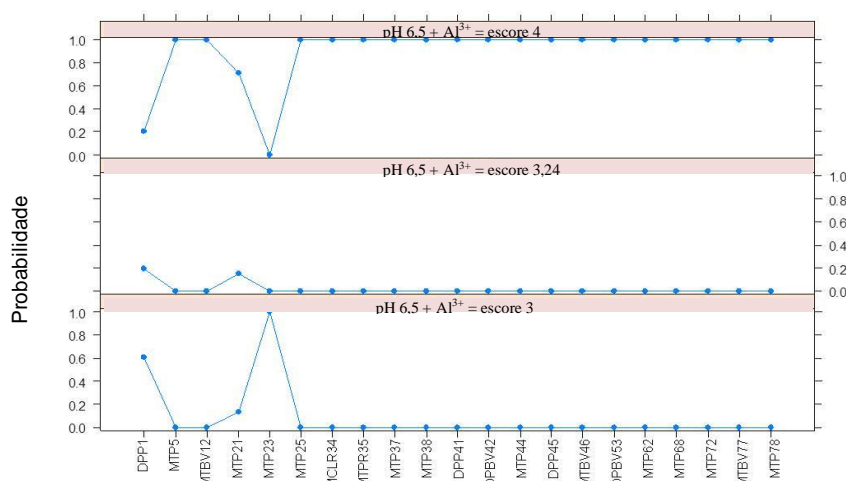
Com os dados da caracterização morfológica, foi elaborado um dendrograma de dissimilaridade usando o método de Ward (Figura 2.7), esse método hierárquico se baseia na mudança de variação dentro e entre grupos em formação a cada passo do processo. O procedimento é conhecido como método da variância mínima por ter como objetivo minimizar a soma de quadrados dentro dos grupos (Puiatti et al., 2013). O dendrograma de dissimilaridade agrupou os isolados de rizóbios em sete grupos a uma similaridade de 53%. O valor em porcentagem ao lado de cada bifurcação do gráfico indica o grau de

confiabilidade da relação entre os isolados. A maioria das bactérias tende a se agrupar conforme a espécie vegetal da qual foram isolados. Segundo Doornbos et al. (2012), há uma seleção de grupos bacterianos específicos pelo efeito rizosférico, em resposta ao metabolismo vegetal, que não ocorre de maneira aleatória. Assim, a planta consegue modular a qualidade/quantidade de material excretado pelas raízes de forma a selecionar microrganismos que vão atuar na rizosfera a seu favor.



entanto, a acidez do meio de cultura, bem como a adição do alumínio, afetou o crescimento de algumas colônias bacterianas. Os isolados DPBV41 e DPBV53 não tiveram crescimento visível, na placa de petri, quando submetidos a um pH 4,5 (sem alumínio) e ao pH 4,5 + Alumínio, caracterizando-se como isolados não tolerantes. Os isolados sensíveis ao baixo pH foram: DPBV42 e DPP1, já os isolados MTP23 e DPP1 foram sensíveis ao Alumínio, como pode ser observado na Figura 2.9 (I; II e III). Os isolados mais afetados pela variação do pH do meio de cultura e toxicidade por alumínio foram as bactérias isoladas da fabácea *Desmanthus pernambucanus*.

A intolerância ao pH ácido está relacionado a dificuldade de manter o pH intracelular entre 7,2 e 7,5, quando o pH externo é ácido (Hara & Oliveira, 2004). A adaptação ao baixo pH é aparentemente desencadeada na maioria das bactérias por genes como actA, actP, Exor, lpa, ActR, e phrR que resultam em uma proteção ácida induzindo o aumento da resistência aos chamados choques ácidos (Dakora, 2012), com consequente sobrevivência de rizóbios em pH baixo. De acordo com Abd-Alla et al. (2014), o gene actA codifica fatores responsáveis por manter o pH interno neutro, quando o pH exterior está abaixo de seis, os microrganismos defeituosos neste gene não são capazes de manter o pH intracelular e não pode crescer a um pH inferior a seis.



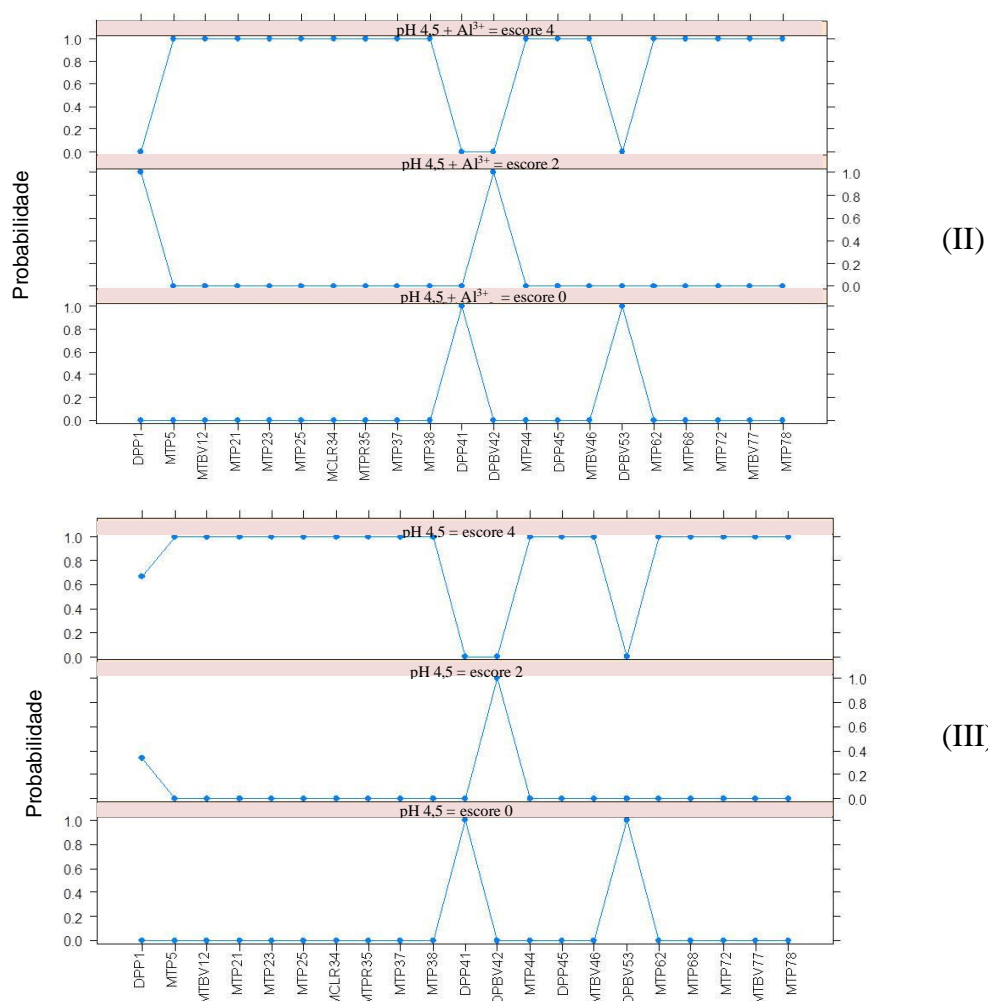


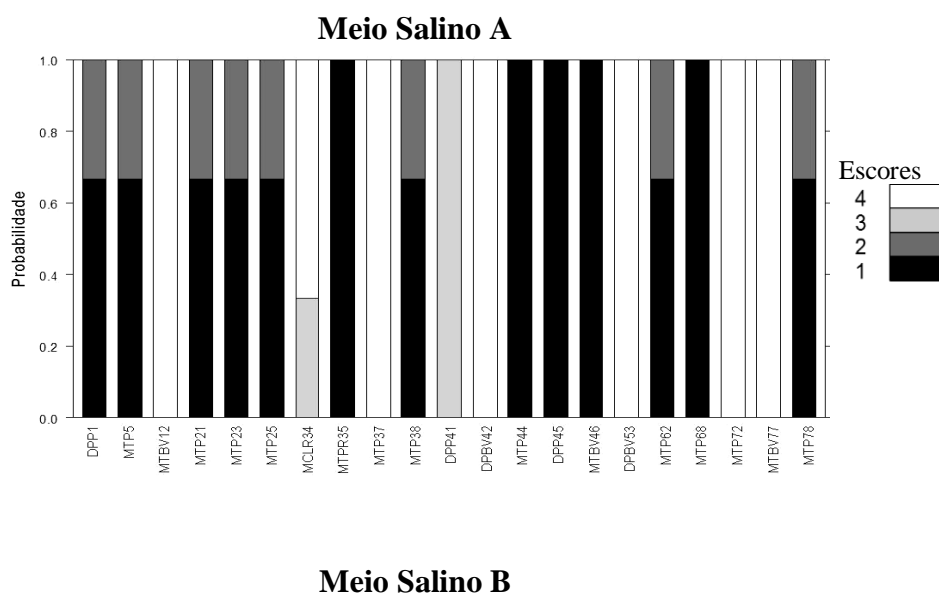
Figura 2.9. Tolerância de rizóbios submetidos à variação de pH do meio de cultura e toxicidade por alumínio. (I) corresponde ao meio de cultura com pH = 6,5+Al³⁺; (II) pH = 4,5+Al³⁺ e (III) pH = 4,5. Escore 0 = intolerante; Escore de 1 a 2 = Sensível; Escore de 2 a 3 = medianos e Escore de 3 a 4= Tolerantes.

2.3.2 Teste de tolerância à salinidade

Todos os isolados de rizóbios cresceram visivelmente, em placa de petri, quando submetidos aos meios de cultura com salinidade elevada. 28,5% dos isolados foram classificados como tolerantes a salinidade do meio A (Tabela 2.3). 9,5% e 62% dos isolados foram classificados com tolerância intermediária e sensíveis ao mesmo meio, respectivamente. O crescimento das colônias de rizóbios quando submetido ao meio salino B foi distribuído da seguinte forma: 24% dos isolados foram classificados como tolerantes e 14% e 62% foram classificados como tolerantes intermediários e sensíveis ao meio B, respectivamente. As colônias de rizóbios que tiveram maiores probabilidades de tolerância foram: MTBV77, MTP72, MTP37, DPBV42 e DPBV53 com crescimento máximo em todas as zonas de repicagem, em ambos os meios (Figura 2.10).

Os isolados DPP41 e MCLR34 também mantiveram seus escores de tolerância intermediária em ambos os meios. A resposta do isolado MTBV12 foi considerada tolerante (escore 4) quando repicado no meio de cultura salino A. No entanto, ao ser submetido ao meio salino B, recebeu a classificação mínima (escore 1) e foi classificado como sensível.

Apesar das águas, usadas para confecção dos meios de cultura, serem classificadas como C4S4 (risco de salinidade muito alto e de sodicidade muito alto) a quantidade de sódio na solução A é quase o dobro em relação à quantidade de sódio na solução B aumentando a condutividade elétrica da solução. Entretanto, a solução B tem o dobro da quantidade de Cl^- em relação à solução A (Tabela 2.3). Esse fator pode ter influenciado a mudança no crescimento do isolado MTBV12. O isolado MTBV46, quando repicado no meio de cultura salino B, foi tolerante ao meio salino. Mas ao ser submetido ao meio salino A, foi classificado como sensível (escore 1).



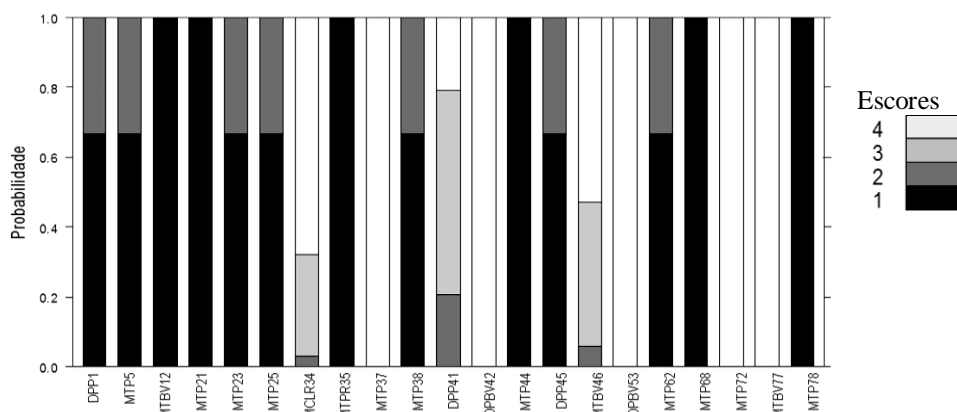


Figura 2.10. Probabilidade de tolerância de isolados de rizóbios submetidos ao meio salino A e B (A e B correspondem a diferentes águas usadas para a confecção dos meios de cultura, tabela 2.3). Escores de 1 a 2 = Sensível; Escore de 2 a 3 = Mediano; Escore de 3 a 4 = Tolerante.

2.3.3 Solubilização de fosfato de cálcio

As bactérias isoladas têm baixa capacidade de solubilização do complexo fosfato de cálcio (Tabela 2.5). Somente o isolado MTBV12 foi classificado como solubilizador intermediário, apresentando índice de solubilização (2,0), seguido dos isolados MTP44 e MTP23, MCLR34, MTP72, MTPR35 e MTP62 que mantiveram índice de solubilização >1. A maior parte dos isolados foi considerada solubilizadoras tardias, iniciando o processo de solubilização após o terceiro dia de crescimento e apenas 9,5% foram considerados precoces, iniciando o processo de solubilização junto com o crescimento da colônia, a partir do primeiro dia de repicagem. Um total de 38%, dos isolados não foi capaz de solubilizar o complexo químico formado no meio de cultura.

Tabela 2.5. Índice de solubilização de fosfato de cálcio de isolados de rizóbio obtidos de áreas de caatinga do Semiárido paraibano.

Isolados	Início da solubilização (Dias após a repicagem)	IS*		Solubilização
		Início	Final	
MCLR34	09	1,3	1,3	Tardia
DPP1	06	0,6	0,6	Tardia
DPP41	06	1,4	1,4	Tardia
DPP45	09	0,5	0,5	Tardia
DPBV53	-	-	-	Não houve
DPBV42	03	0,7	0,2	Precoce
MTP5	06	0,6	1,0	Tardia
MTPR35	06	1,1	1,1	Tardia
MTP62	06	1,1	1,6	Tardia
MTP38	-	-	-	Não houve
MTP68	18	0,7	0,7	Tardio
MTP78	-	-	-	Não houve

MTP23	03	1,06	1,3	Precoce
MTP21	-	-	-	Não houve
MTBV46	-	-	-	Não houve
MTBV77	-	-	-	Não houve
MTBV12	06	2,0	2,0	Tardia
MTP25	-	-	-	Não houve
MTP72	06	1,3	0,9	Tardia
MTP37	-	-	-	Não houve
MTP44	03	1,3	1,4	Precoce

* Índice de solubilização= diâmetro do halo/diâmetro da colônia

Dentre os isolados avaliados pode-se observar uma baixa solubilização de fosfato de cálcio. Essa característica negativa pode estar relacionada ao fato de que estes isolados não apresentam a atividade solubilizadora, ou a glicose não é a fonte de carbono ideal para expressão desta característica. Apesar de o meio GL ter sido descrito há mais de 30 anos por Sylvester-Bradley e colaboradores (1982) e ser utilizado em diversos estudos para avaliar a capacidade de solubilização de fosfatos por bactérias diazotróficas, a utilização da glicose como fonte de carbono para a expressão de tal característica pode não favorecer a determinados isolados uma vez que há resultados de pesquisas que descreveram a influência da fonte de carbono sobre o poder de solubilização de fosfato de cálcio em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas (Oliveira et al., 2009).

Na implementação da tecnologia de inoculação de rizóbios em fabáceas, existe a necessidade da verificação prévia de compatibilidade e eficiência simbiótica dos mesmos. A princípio é importante à realização de ensaios em condições controladas que verifiquem a capacidade de nodulação, efeitos no crescimento e quantidade de nitrogênio fixada via simbiose, tais fatores constituem importantes parâmetros no processo de seleção de estirpes e na recomendação de inoculantes (Moreira e Siqueira, 2006).

A eficiência simbiótica dos isolados de rizóbios foi testada sob condições estériles em casa vegetação (Tabela 2.6). Todos os isolados foram capazes de nodular o feijão-macassa. O isolado que propocionou a maior produção de nódulos foi o MTPR35 com massa seca dos nódulos de 32,6 mg.

Tabela 2.6. Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa seca dos nódulos (MSN), obtidos no ensaio de nodulação com feijão-macassa.

Isolados	MSPA mg planta ⁻¹	Nº Nódulos mg planta ⁻¹	MSN mg planta ⁻¹
DPP1	1.152,4 ^a	1 ^c	1,6 ^b
MTP5	1.051,9 ^a	1 ^c	3,0 ^b

MTBV12	1.040,3 ^a	1 ^c	2,5 ^b
MTP21	1.030,3 ^a	2 ^c	2,2 ^b
MTP23	1.016,5 ^a	2 ^c	5,1 ^b
MTP25	852,7 ^a	1 ^c	1,8 ^b
MCLR34	3.544,2 ^a	1 ^c	1,4 ^b
MTPR35	768,8 ^a	27 ^a	32,6 ^b
MTP37	1.070,4 ^a	4 ^{bc}	8,5 ^b
MTP38	904,8 ^a	2 ^c	6,0 ^b
DPP41	1.022,1 ^a	1 ^c	2,7 ^b
DPBV42	1.170,8 ^a	5 ^{bc}	7,0 ^b
MTP44	971,5 ^a	3 ^{bc}	2,4 ^b
DPP45	789,3 ^a	4 ^{bc}	3,7 ^b
MTBV46	861,3 ^a	1 ^c	1,3 ^b
DPBV53	1.081,8 ^a	3 ^{bc}	68,3 ^a
MTP62	1.149,8 ^a	5 ^{bc}	8,6 ^b
MTP68	1.264,3 ^a	4 ^{bc}	7,0 ^b
MTP72	1.071,0 ^a	3 ^{bc}	27,6 ^b
MTBV77	1.352,0 ^a	9 ^b	23,6 ^b
MTP78	934,0 ^a	1 ^c	3,0 ^b
CONTROLE	726,7 ^a	0 ^c	0 ^b

Médias seguidas pela mesma letra na mesma variável não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Freitas et al. (2011), avaliando a nodulação e fixação de nitrogênio por fabáceas forrageiras da caatinga cultivadas em solos do Semiárido paraibano, observaram que a espécie *Desmanthus pernambucanus* (Jureminha), *Macroptilium martii* (Orelha de onça) e *Macroptilium lathyroides* (Feijão de rolinha) possuem capacidade de nodular abundantemente em solos do Semiárido, porém essa capacidade depende do tipo de solo. Essas três espécies apresentam alta capacidade de fixação biológica de nitrogênio (valores acima de 50% na maioria das plantas), chegando, em alguns casos, a 85% de nitrogênio derivado da atmosfera.

O isolado MTBV77 produziu em média nove nódulos com massa seca de 23,6 mg, já os isolados DPBV42 e MTP62 produziram cinco nódulos cada, com massa seca de 7,0 e 8,6 mg respectivamente. Apesar do maior número de nódulos, os isolados mencionados não conferiam acréscimo na produção de massa seca da parte aérea das plantas. As médias da massa seca da parte aérea foram consideradas iguais a ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os isolados de rizóbios nativos avaliados nesse trabalho, após serem inoculados me feijão-macassa, produziram nódulos de tamanhos variados alterando a massa seca dos mesmos. Segundo Chagas Junior et al. (2010), feijão-caupi é capaz de nodular com diversas espécies de bactérias do grupo rizóbio, especialmente do gênero *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*. Esta característica é uma vantagem

ecológica para a adaptação deste vegetal, isto porque normalmente a cultura apresenta baixa especificidade de nodulação.

2.4 Conclusão

Os isolados bacterianos selecionados têm crescimento rápido e acidificam o meio de cultura. Com principais características culturais de colônias irregulares, elevação umbiculada, superfície lisa e produção de exopolissacarídeos moderada.

Os isolados nativos de *Mimosa tenuiflora* são mais tolerantes ao estresse salino, acidez, e toxicidade por alumínio, em comparação as demais bactérias nativas isoladas de *Desmanthus pernambucanus* e *Mimosa caesalpinifolia*.

Os isolados de rizóbios nativos avaliados neste trabalho têm baixa capacidade de solubilização do complexo fosfato de cálcio, exceto o isolado MTBV12, classificado como solubilizador intermediário do complexo fosfato de cálcio.

Todos os isolados de rizóbios nativos são capazes de nodular a espécie *Vigna unguiculata*, porém não há acréscimo significativo estatisticamente, na matéria seca da parte aérea das plantas que possam ser proveniente da simbiose com essas bactérias.

Bibliografia

ABD-ALLA, M. H; EL-ENANY, A. E; BAGY, M. K; BASHANDY, S. R; Alleviating the inhibitory effect of salinity stress on nod gene expression in *Rhizobium tibeticum* - fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) symbiosis by isoflavonoids treatment. **Journal of Plant Interactions**. v.9, n.1, p.275-284, 2014.

BAKKE, I. A; FREIRE, A. L. O; BAKKE, A. O; ANDRADE, A. P; BRUNO, A. R. L; Water and sodium chloride effects on *Mimosa tenuiflora* (willd.) poiret seed germination. **Revista Caatinga**. v.19, n.3, p.261-267, 2006.

BARCELLOS, A. O.; RAMOS, A. K. B.; VILELA, L.; MARTHA JUNIOR G. B. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, p.51-67, 2008.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J Microbiol Biotechnol**. v.28, p.1327–1350, 2012.

CANFORA, L.; SALVATI, L.; BENEDETTI, A.; FRANCAVIGLIA, R. Is soil microbial diversity affected by soil and groundwater salinity? Evidences from a coastal system in central Italy. **Journal of Environmental Monitoring**. 189:319, 2017, DOI 10.1007/s10661-017-6040-1.

CAO, Y.; WANG, E.; ZHAO, L. et al. Diversity and distribution of rhizobia nodulated with *Phaseolus vulgaris* in two ecoregions of China. **Soil Biology & Biochemistry**. v.78, p.128-137, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.026>

CHAGAS JUNIOR, A. F.; RAHMEIER, W.; FIDELIS, R. R.; SANTOS, G. R.; CHAGAS, L. F. B.; Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi no Cerrado. **Revista Ciência Agronômica**. v. 41, n. 4, p. 709-714, out-dez, 2010

DAKORA, F. D. Root-nodule bacteria isolated from native *Amphithalea ericifolia* and four indigenous *Aspalathus* species from the acidic soils of the South African fynbos are tolerant to very low pH. **African Journal of Biotechnology**. v.11, n.16, p.3766-3772, 2012. DOI 10.1007/s11274-011-0979-9.

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere a review. **Agronomy for Sustainable Development**. v.32, p.227-243, 2012.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; CATANHO P. L. C. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do Estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**. v. 66, n.3, p.497-504, 2007.

FREITAS, A.D.S.; SILVA, T.O.; MENEZES R.S.C. et al. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.9, p.1856-1861, 2011.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**. v.34, n.2, p. 343-357, 2004.

HUNGRIA M. & SILVA K.; **Manual de curadores de germoplasma – Micro-organismo: Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Brasília, DF; 2011.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S; **Manual de métodos empregados em estudo de microbiologia agrícola**. Embrapa Documentos. v.46, p.1-519, 1994.

KAPEMBWA, R.; MWEETWA, A.M.; NGULUBE, M.; YENGWE, J. Morphological and Biochemical Characterization of Soybean Nodulating Rhizobia Indigenous to Zambia. **Sustainable Agriculture Research**. v.5, n.3, 2016.

LARANJO, M. OLIVEIRA, S. Tolerance of *Mesorhizobium* type strains to different environmental stresses. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.99, p.651–662, 2011.

LEBRAZI, S. F; BENBRAHIM, K. Environmental stress conditions affecting the N₂ fixing *Rhizobium*-legume symbiosis and adaptation mechanisms. **African Journal of Microbiology Research**. v.8, n.53, p.4053-4061, 2014.

MEDEIROS E.V.; MARTINS C.M.; LIMA J.A.M.; FERNANDES Y.T.D.; OLIVEIRA V.R.; BORGES W.L.; Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado

em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum Agronomy**. v.31, p.529-535, doi: 10.4025/actasciagron.v31i3.793. 2009.

MELLONI, R.; MOREIRA F. M. S; NÓBREGA, R. S. A; SIQUEIRA, J. O; Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p.235-246, 2006.

MOJENA, R. Hierárquical grouping method and stopping rules: an evaluation. **Computer Journal**. v.20, p.359-363, 1977.

MOREIRA, F.M.M.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora da UFLA, 726p. 2006.

NORRIS, D. O.; DATE, R. A. Legume Bacteriology. In: SHAM, N.H.; BRYAN, W.W. (ed). **Tropical Pasture Research** – Principles and Methods. Hurley: common wealt bureau of pastures and field crops. p. 134-174. (bulletin, 51). 1976.

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **Euro J Soil Biological**. v. 45, p. 106–113. 2009.

PUIATTI, G. A.; CECON P. R.; NASCIMENTO, M.; PUIATTI, M.; FINGER, F. L.; SILVA, A. R. NASCIMENTO, A. C. C.; Análise de agrupamento em seleção de modelos de Regressão não lineares para descrever o acúmulo de Matéria seca em plantas de alho. **Revista Brasileira de Biometria**. v.31, n.3, p.337-351, 2013.

SANTOS, C. E. R. S; STAMFORD, N. P; NEVES, M. C. P; NORMA, G. R; WARDSON, L. B; ROSEMBERG, V. B; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.2, n.4, p.249-256, 2007.

STRALIOTTO, R. **Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares no Estudo da Biodiversidade do Rizóbio**. Embrapa. p. 42, 2006.

STRALIOTTO, R. **Diversidade do Rizóbio – Evolução dos Estudos Taxonômicos**. Embrapa. p.37, 2015.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Quantitative survey of phosphate solubilizing microorganisms in the rhizosphere of grasses and legumes in the Amazon. **Acta Amazonica**, v.12, p.15-22, 1982.

VENTORINO, V.; CAPUTO, R.; PASCALE, S. Response to salinity stress of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains in the resence of different legume host plants. **Ann Microbiol**. v.62, p.811–823, 2012. doi 10.1007/s13213-011-0322-6

VINCENT, J. M; A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford, **Blackwell Scientific Publications**. 164p. 1970.

WARD, J. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of American Statistical Association.** v.58, p.236-244, 1963.

XAVIER G.R.; MARTINS L.M.V.; ZILLI J.E.; PEIXOTO R.C.; RUMJANEK N.G. Protocolo operacional cultivo de planta isca para isolamento de rizóbio a partir de nódulo de planta-isca. **Embrapa-Agrobiologia.** 7p. 1997.

CAPÍTULO III

DIVERSIDADE GENÉTICA DE RIZÓBIOS NATIVOS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO ACESSADA POR PCR-RFLP

DIVERSIDADE GENÉTICA DE RIZÓBIOS NATIVOS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO ACESSADA POR PCR-RFLP

Resumo: A avaliação da diversidade genética e estrutura populacional das estirpes agrícolas eficientes na fixação biológica de nitrogênio e adaptadas às diversas condições edafoclimáticas da região de origem, podendo ser usado comercialmente na forma de inoculantes. Com isso, os objetivos do trabalho foi caracterizar os isolados de rizóbios nativos do Semiárido através da amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* por meio da técnica duplex PCR. Determinar a diversidade genética dos isolados pela técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (PCR-RFLP) utilizando as endonucleases *HhaI*, *MspI* e *HinfI* e quantificar a produção de compostos indólicos *in vitro*. Os isolados de rizóbios foram selecionados conforme a amplificação dos fragmentos dos genes simbióticos *nifH* e *nodC* para posterior avaliação da diversidade genética acessada por PCR-RFLP. Para tal, o gene 16S rRNA foi amplificado, empregando os iniciadores universais 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT). As reações de restrições foram realizadas utilizando as endonucleases *HhaI*, *MspI* e *HinfI*. O produto da digestão foi submetido à

eletroforese horizontal em gel de agarose a 3%, em tampão TAE 1% por 80 min a 100 Volts. Para a quantificação dos Compostos Indólicos foi utilizado o método colorimétrico na avaliação das colônias crescidas com L-triptofano (3,5 mg) e sem L-triptofano em meio de cultura YM. Nas avaliações de amplificação simultânea dos genes simbióticos, dentre os 80 isolados de rizóbios testados, 16 amplificaram apenas o gene *nifH* e cinco isolados amplificaram ambos os genes *nifH*+*nodC*, simultaneamente. A variabilidade genética dos 21 isolados de rizóbios variou de acordo com cada enzima de restrição (*HinfI*, *HhaI* e *MspI*) e resultou em diferentes perfis de restrição, os genes foram transformados em dados binários e por meio do complemento do coeficiente de Jaccard. Foi obtida a matriz de dissimilaridade genética foi construído um dendrograma pelo método de Ward, com o número de grupos definido pelo método de Mojena, resultando em IV grupos. Em média, a distância entre os pares de genótipos foi de 0,56. Destacaram-se como os pares mais divergentes os isolados DPP1 e MTP44, com distancia de 0,89 e os mais similares, MTP72 e MTBV77, com distância de 0,10. A produção de Compostos Indólicos foi maior nas amostras onde houve acréscimo de L-triptofano, precursor do ácido-indol-acético, pelas bactérias MTBV12, MTBV77, MTP78 e MTP37. Os isolados de rizóbios nativos tem alta diversidade genética e se agrupam com base na planta isca da qual são isolados. A produção de compostos indólicos é variável entre os isolados selecionados e é potencializada na presença do precursor L-Triptofano.

Palavras-chave: Caatinga, Fixação biológica de nitrogênio, bactérias diazotróficas

GENETIC DIVERSITY OF NATIVE RHIZOBIA OF SEMI-ARID PARAIBANO ACCESSED BY PCR-RFLP

Abstract: The evaluation of the genetic diversity and population structure of the native communities is a valuable source in the discovery of agricultural strains efficient in the biological fixation of nitrogen and adapted to the diverse edaphoclimatic conditions of the region of origin and can be applied in the development of its commercial use in the form of inoculants. Therefore, the objective of this work was to authenticate isolates of native rhizobia from the semi-arid region through the simultaneous amplification of fragments of the *nifH* and *nodC* genes by means of the duplex PCR technique. To determine the genetic diversity of the isolates by the amplified ribosomal DNA restriction analysis (PCR-RFLP) technique using the *HhaI*, *MspI* and *HinfI* endonucleases and quantify the production of in vitro indole compounds. The rhizobia isolates were selected according to the amplification of the fragments of symbiotic genes *nifH* and *nodC* for further evaluation of the genetic diversity accessed by PCR-RFLP. For this, the 16S rRNA gene was amplified using the 27F universal primers (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) and 1492R (TACGGYTACCTTGT TACGACTT). Restriction reactions were performed using the *HhaI*, *MspI* and *HinfI* endonucleases. The digestion product was subjected to horizontal electrophoresis in 3% agarose gel in 1% TAE buffer for 80 min at 100 Volts. For the quantification of Indolic Compounds, the colorimetric method was used to

evaluate the colonies added with L-tryptophan (3.5 mg) and without L-tryptophan in YM culture medium. In the simultaneous amplification evaluations of symbiotic genes, among the 80 rhizobia isolates tested, 16 amplified only the *nifH* gene and five isolates amplified both *nifH* + *nodC* genes simultaneously. The genetic variability of the 21 rhizobia isolates varied according to each restriction enzyme (*HinfI*, *HhaI* and *MspI*) and resulted in different restriction profiles transformed into binary data and evaluated through genetic dissimilarity matrix by the complement of the Jaccard coefficient. From the dissimilarity matrix a dendrogram was constructed by the Ward method, with the number of groups defined by the Mojena method, resulting in IV groups. On average, the distance between pairs of genotypes was 0.56. The most divergent pairs were the DPP1 and MTP44 isolates, with a distance of 0.89 and the most similar MTP72 and MTBV77 with a distance of 0.10. The production of Indole Compounds was higher in the samples where there was an increase of L-tryptophan, precursor of indole-acetic acid, by bacteria MTBV12, MTBV77, MTP78 and MTP37. The isolates of native rhizobia have high genetic diversity and are grouped based on the bait plant from which they are isolated. The production of Indole Compounds is variable among the selected isolates and is potentiated in the presence of the L-Tryptophan precursor.

Keywords: Caatinga, Biological fixation of nitrogen, diazotrophic bacteria

3.1 Introdução

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma importante via de entrada de N nos ecossistemas terrestres e pode ser realizados por microrganismos simbióticos, popularmente chamados de rizóbios de vida livre presentes no solo (Li et al., 2018). A biodiversidade microbiana do solo é determinada pela combinação das condições ambientais que exercem grande influência na biota do solo. Além da constante competitividade por ocupação e absorção de nutrientes, a quantidade de células bacterianas é dependente das variáveis ambientais, como a profundidade do solo, pH, umidade e temperatura que geralmente são limitantes a FBN (Santos et al., 2010).

Para superar essas limitações, são realizadas extensas pesquisas em várias partes do mundo, a fim de caracterizar e arquivar a biodiversidade local dos rizóbios, como uma fonte valiosa de estirpes agrícolas rizobianas que além de serem eficientes na FBN, também sejam especificamente adaptadas às diversas condições edafoclimáticas da região (Efrose et al., 2018). A avaliação da diversidade genética e da estrutura populacional das comunidades nativas pode levar ao desenvolvimento do seu uso comercial na forma de inoculantes (Stefan et al., 2018).

Muitas tentativas têm sido feitas para determinar a composição e as características das estirpes nativas isoladas de diferentes espécies de fabáceas. O desenvolvimento de métodos de genética molecular e da disponibilidade da análise de PCR (Polymerase chain reaction), como base na aplicação de métodos sensíveis e precisos permitiu a diferenciação de estirpes de bactérias estreitamente relacionadas e a detecção de alta diversidade de rizóbios (Boakye et al., 2016). O gene 16S rRNA é comumente usado nas análises de diversidade genética, geralmente aplicados para avaliar a posição filogenética de microorganismos, ao passo que as análises dos genes *nifH* e *nodC* revelam o genótipo simbiótico das bactérias. Os genes relacionados à simbiose são elementos móveis que são transferíveis entre as cepas. O gene *nifH*, codifica a proteína nitrogenase, indispensável para a fixação simbiótica de nitrogênio e o gene *nodC*, essencial para a síntese do fatores de nodulação e sinalização entre micro e macro simbiontes (Zou et al., 2016).

Com isso, os objetivos do trabalho foi a caracterização dos isolados de rizóbios nativos através da amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* por meio da técnica duplex PCR. Determinar a diversidade genética dos isolados pela técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (PCR-RFLP) utilizando as endonucleases *HhaI*, *MspI* e *HinfI* e quantificar a produção de compostos indólicos *in vitro*.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Seleção dos isolados de rizóbios por meio da amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*

As bactérias simbióticas utilizadas nesse estudo foram isoladas do solo proveniente de locais específicos, oriundos dos municípios de Boa Vista, Pocinhos e São Sebastião de lagoa de Roça - Paraíba. Foram utilizadas três fabáceas nativas como plantas isca, *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung., *Mimosa caesalpinifolia* Benth. e *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir., conhecidas popularmente como Jureminha, Sabiá e Jurema preta, respectivamente. Após a nodulação em casa de vegetação as bactérias foram isoladas, purificadas e caracterizadas fenotipicamente conforme método descrito por Vincent (1970). Após o procedimento de purificação das colônias bacterianas, foi extraído o DNA dos isolados de acordo com Fernandes-Junior et al., (2013). Para isso, as bactérias foram cultivadas em meio YM (Levedura e Manitol) sem indicador de pH por três dias, sob agitação orbital a 150 rotações por minuto (rpm), à temperatura ambiente. Após o crescimento, alíquotas de 1 mL foram centrifugadas a 1200 rpm por três minutos,

descartando-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em água ultrapura por duas vezes consecutivas após a centrifugação (1ª ressuspensão 500 µL e 2ª ressuspensão 200 µL de água ultrapura), sempre descartando o sobrenadante. Em seguida, para que ocorresse o processo de ruptura das células bacterianas, as amostras foram congeladas à temperatura de -20°C e, após o congelamento, foram levadas ao banho maria por 5 minutos à temperatura de fervura. Esse procedimento simultâneo de congelamento e aquecimento, provocando o choque térmico, foi realizado três vezes. O produto da extração foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% a 100 V por 60 minutos. O gel foi corado com brometo de etídeo (8 pM) adicionado após a fusão e durante o resfriamento (60 °C) da agarose. A visualização do gel se deu através de um transluminador com luz UV acoplado ao fotodocumentador, modelo Gel Logic 112.

A amplificação dos fragmentos dos genes simbióticos *nifH* e *nodC*, ocorreu de acordo com o protocolo estabelecido por Fernandes-Júnior et al. (2013), utilizando os iniciadores PolF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) e PolR (ATSGCCATCATYTCRCCGGA), para amplificação de um fragmento do gene *nifH* que contém em torno de 360 pb (Poly et al., 2001) e NodCF (AYGTHGTYGAYGACGGTTC), NodCR(I) (CGYGACAGCCANTCKCTATTG) para amplificação de um fragmento do gene *nodC* com aproximadamente 980 pb (Laguerre et al., 2001).

Os isolados que não apresentaram amplificação positiva para o gene *nodC* na reação de duplex-PCR, mas amplificaram o gene *nifH* foram submetidos à amplificação de fragmentos do gene *nodC* utilizando os iniciadores nodCF_{ForBurk} (CTCAATGTACACARNGCRTA) e nodCR_{RevBurk} (GAYATGGARTAYTGGYT), descritos por Elliott et al. (2007) e desenhados para a amplificação em β-rizóbios, principalmente os do gênero *Burkholderia*. As reações foram dimensionadas para um volume final de 20 µL, o mix de reação usado em cada amplificação se encontra detalhado na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição do mix de reação e programação da PCR para a amplificação de segmentos dos genes *nifH* e *nodC* em sistema Duplex e NodC *Burkholderia* pelo sistema Uniplex.

Iniciadores	PolF/PolLR + NodCF/NodCR(I)	(nodCF+ nodCR)Burk
	Sistema Duplex	Sistema Uniplex
Tampão de reação	1X	1X
MgCl ₂	2,5 mM	2,7 mM
dNTP	1,2 mM	0,8 mM
Taq DNA polimerase	0,25 U	0,2 U
Iniciador (Forward/Reverse)	1,0 µM (<i>nifH</i>) + 0,6 µM (<i>nodC</i>)	0,75 µM
DNA	2 µL	2 µL

Programa da PCR				
Desnaturação inicial	94° C por 5 min	35 Ciclos	94° C por 5 min	35 Ciclos
Desnaturação	94 °C por 1 min		94 °C por 1 min	
Anelamento	55 °C por 45 s		55 °C por 1 min	
Extensão	72 °C por 1 min		72 °C por 1 min	
Extensão final	72 °C por 1 min		72 °C por 1 min	

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% a 120 V por 60 minutos. O gel foi corado com brometo de etídeo (8 pM) adicionado após a fusão e durante o resfriamento (60 °C) da agarose. A visualização do gel se deu através de um transluminador com luz UV acoplado ao fotodocumentador, modelo Gel Logic 112. A partir da seleção dos isolados positivos para amplificação de pelo menos um dos genes simbióticos (*nifH* e/ou *nodC*), prosseguiu-se com a análise de restrição e produção de compostos indólicos.

3.2.2 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (PCR-RFLP)

Para os isolados selecionados nas reações de Duplex-PCR, foi realizada a avaliação da diversidade genética por meio da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Para tal, o gene 16S rRNA foi amplificado empregando os iniciadores universais 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (Weisburg et al., 1991). Para a amplificação, o volume final foi ajustado para 40 µL contendo o mix de reação (tabela 3.2). O produto da amplificação foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose, visualizado em fotodocumentador com luz UV, conforme descrito anteriormente. As reações de restrição foram realizadas utilizando-se as endonucleases *HhaI*, *MspI* e *HinfI*, conforme as orientações do fabricante. As reações ocorreram durante 3 horas a 37 °C e os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 3%, em tampão TAE 1%, por 80min a voltagem constante de 100 V.

Tabela 3.2. Composição do mix de reação e programação da PCR para a amplificação de segmentos do gene 16S rRNA em sistema uniplex.

Iniciadores	27F/1492R
Tampão de reação	1X
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP	0,25 mM
Taq DNA polimerase	1 U
Iniciador (Forward/Reverse)	0,25µ mol L ⁻¹ (cada)
DNA	2 µL
Programa da PCR	
Desnaturação inicial	94° C por 4 min

Desnaturação	94 °C por 1 min	
Anelamento	60 °C por 45 s	35 Ciclos
Extensão	72 °C por 2 min	
Extensão final	72 °C por 5 min	

Para a estimativa dos tamanhos dos fragmentos moleculares, foi utilizado o marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen®). O gel foi corado com brometo de etídeo (8 pM) adicionado após a fusão e durante o resfriamento da agarose e visualizadas em fotodocumentador com luz UV.

As imagens dos géis foram analisadas conforme o padrão de bandeamento. A presença de uma banda foi codificada por um (1) e ausência zero (0), gerando um arquivo de dados binários. As estimativas de similaridade entre todos os pares de acessos (ii') foram convertidas em matriz de dissimilaridade por meio do complemento aritmético (D) do coeficiente de similaridade de Jaccard, expresso da seguinte forma:

$$D = 1 - S_j = a / (a + b + c)$$

Onde:

- a, representa presença da banda no indivíduo *i* e no indivíduo *j*;
- b, representa presença da banda no indivíduo *i* e ausência no indivíduo *j*;
- c, representa ausência da banda no indivíduo *i* e presença no indivíduo *j*.

O agrupamento foi feito usando o método de ward, o resultado foi representado na forma de dendrograma e avaliado pelo coeficiente de correlação cofenética (CCC), o grau de confiabilidade das bifurcações do dendrograma, calculada entre os elementos da matriz original e os da matriz cofenética, resultante da simplificação proporcionada pelo método de agrupamento, depois da construção do dendrograma. Valores de CCC superiores a 0,8 indicam boa representatividade entre as distâncias (Arriel et al., 2006). O método de agrupamento usado foi a variância mínima de Ward (1963), com o número de grupos definido pelo método de Mojena (1977), onde o ponto de corte = média + kDP k = 1,25. DP = Desvio padrão. As análises estatísticas da diversidade genética foram feitas usando o software Genis (2013).

3.2.3 Produção de compostos indólicos “*in vitro*”

As avaliações sobre a capacidade dos isolados em produzir Compostos Indólicos (CI) “*in vitro*” foram realizadas com os isolados selecionados nas reações de duplex-PCR.

Foi utilizado o método colorimétrico de Sarwar e Kremer (1995). Os isolados foram crescidos em placas de Petri com meio YMA (Levedura, Manitol e Agar) para verificação de pureza. As colônias puras foram transferidas com o auxílio de uma alça de platina para tubos de ensaio contendo 3 mL de meio YM (Levedura e Manitol) para formação do pré-inóculo. Após 48h de crescimento, 150 µl do pré-inóculo foi inoculado em tubos de ensaio com meio LM sem azul de bromotimol acrescidos com L-triptofano (3,5 mg) e sem L-triptofano com três repetições por isolado. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente sob agitação por 72 h. Após o período de crescimento bacteriano, a densidade ótica (DO) das culturas foi avaliada e ajustada para a absorbância de 530nm. Em seguida ao ajuste das concentrações das amostras, alíquotas de 2 mL da cultura foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. Para a estimativa da produção de compostos indólicos em 1 mL do sobrenadante das amostras centrifugadas foram adicionados 500 µL de reagente de Salkowski [(1 mL de FeCl_3 0,5 mol.L⁻¹ + 49 26 mL de HClO_4 (35%)]]. As amostras foram incubadas no escuro durante 30 minutos. A intensidade da coloração vermelha foi lida em espectrofotômetro 600 Plus. Para a estimativa da produção dos compostos indólicos, os dados de absorbância foram interpolados em uma curva padrão, previamente obtida, com concentrações conhecidas de CI que variam de zero a 500 µg mL⁻¹ (Figura 3.1).

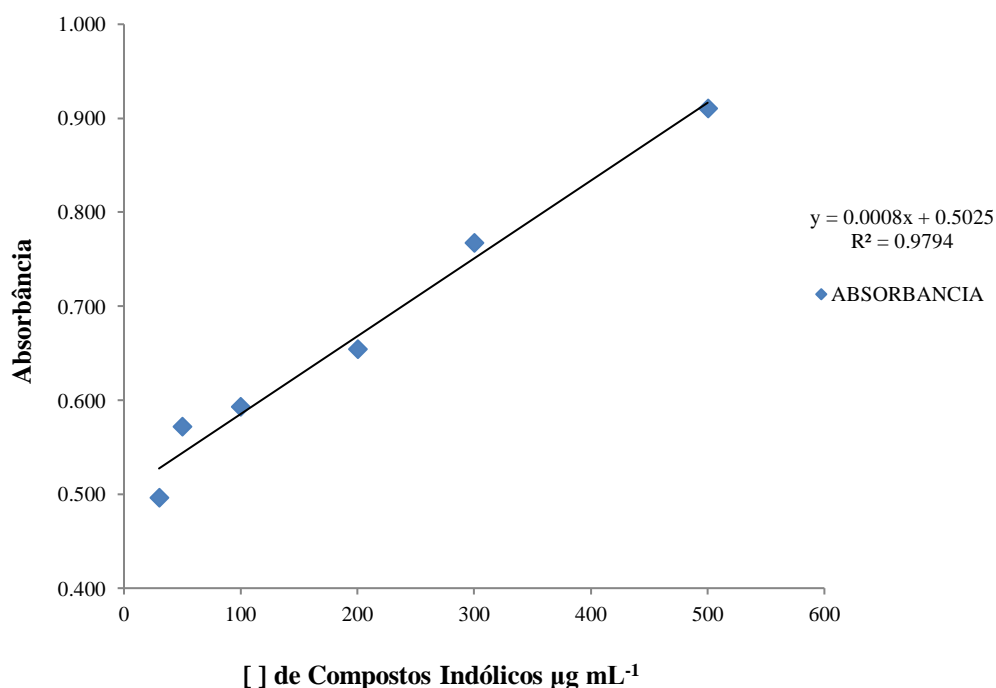


Figura 3.1. Curva padrão com diferentes concentrações (µg mL⁻¹) de compostos indólicos (CI), quantificados em espectrofotômetro a 530 nm.

Os resultados da produção de Compostos Indólicos por isolados de rizóbios foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scotknot a 5% de probabilidade, utilizando o pacote estatístico RStudio.

3.3 Resultados e Discussão

Foram selecionados e purificados 80 isolados de rizóbios, dos quais 21 tiveram amplificação positiva para os fragmentos *NifH* e *NodC* ou pelo menos para um dos dois. Os isolados com amplificação positiva foram identificados como: MCLR34, DPP1, DPP41, DPP45, DPBV53, DPBV42, MTP5, MTPR35, MTP62, MTP38, MTP68, MTP78, MTP23, MTP21, MTBV46, MTBV77, MTBV12, MTP25, MTP72, MTP37, MTP44. Onde, as duas primeiras letras, da sigla de identificação dos rizóbios, correspondem ao gênero e epíteto específico da planta isca da qual foram retirados os nódulos, seguidas da letra que corresponde ao local de coleta do solo. Assim, DP, MT e MC são correspondentes à *Desmanthus pernambucanus*, *Mimosa tenuiflora* e *Mimosa caesalpiniiifolia* e BV, LR e P correspondem, respectivamente, à Boa Vista, São Sebastião de Lagoa de Roça e Pocinhos – Paraíba.

A adaptação de um protocolo de PCR que possibilite a amplificação simultânea dos genes *nifH* e *nodC*, (Figura 3.2) em um sistema duplex, é indispensável para a redução do trabalho e do tempo gasto com a autenticação das bactérias isoladas de nódulos de fabáceas (FERNANDES JUNIOR et al., 2013).

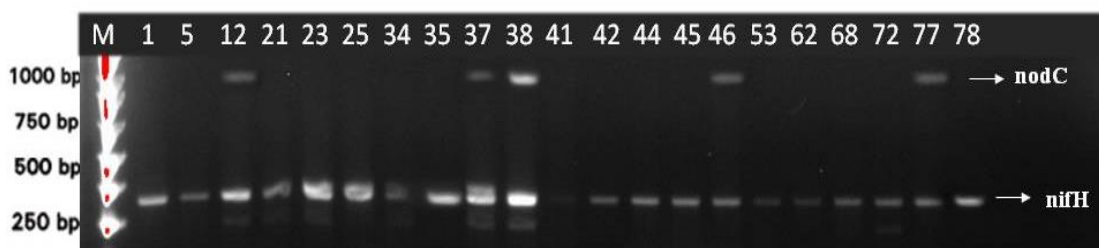


Figura 3.2. Amplificação dos genes *nifH* e *nodC*; Os números de 1 à 78 representam os isolados provenientes de nódulos de *Desmanthus pernambucanus*, *Mimosa tenuiflora* e *Mimosa caesalpiniiifolia*; M = marcador de peso molecular de 1kb.

Além de ter vantagem sobre a detecção de um único *amplicon*, reduzindo o custo das reações e maximizando a utilização dos equipamentos, possibilita o teste de um maior número de isolados ao mesmo tempo. Nas avaliações de amplificação simultânea dos dois genes, dentre os 80 isolados de rizóbios testados, 16 amplificaram apenas o gene *nifH*,

foram eles: DPP1, MTP5, MTP21, MTP23, MTP25, MCLR34, MTP35, DPP41, DPBV42, MTP44, DPP45, DPBV53, MTP62, MTP68, MTP72 e MTP78, e cinco isolados, amplificaram ambos os genes *nifH+nodC*, simultaneamente (Figura 3.2).

Os isolados que amplificaram os genes *nifH+nodC* foram: MTBV12, MTP37, MTP38, MTBV46, MTBV77. Segundo Mothapo et al. (2013), a amplificação individual dos genes *nifH* e *nodC* foi proposta como avaliação prévia da capacidade diazotrófica e nodulífera de bactérias isoladas de nódulos de fabáceas, com vantagem a reação em duplex, além de contribuir para a autenticação das bactérias resulta numa economia de tempo e de recursos, uma vez que, ambas as amplificações podem ser conduzidas de forma simultânea. Apesar de Bontemps et al. (2015), indicarem que a maioria das espécies endêmicas do gênero *Mimosa* são noduladas predominantemente por Betaproteobacteria representado principalmente por bactérias do gênero *Burkholderia* e *Cupriavidus*, não houve amplificação positiva dos isolados testados nesse estudo que indiquem participação no referido grupo.

A variabilidade genética dos 21 isolados de rizóbios foi avaliada por meio da técnica de PCR-RFLP, utilizando as enzimas de restrição *HinfI*, *HhaI* e *MspI* que resultou em três padrões distintos de bandejamento (Figura 3.3). Um total de 39 perfis foi gerado pelas enzimas de restrição, 37 destes foram considerados polimórficos com apenas dois locus monomórficos.

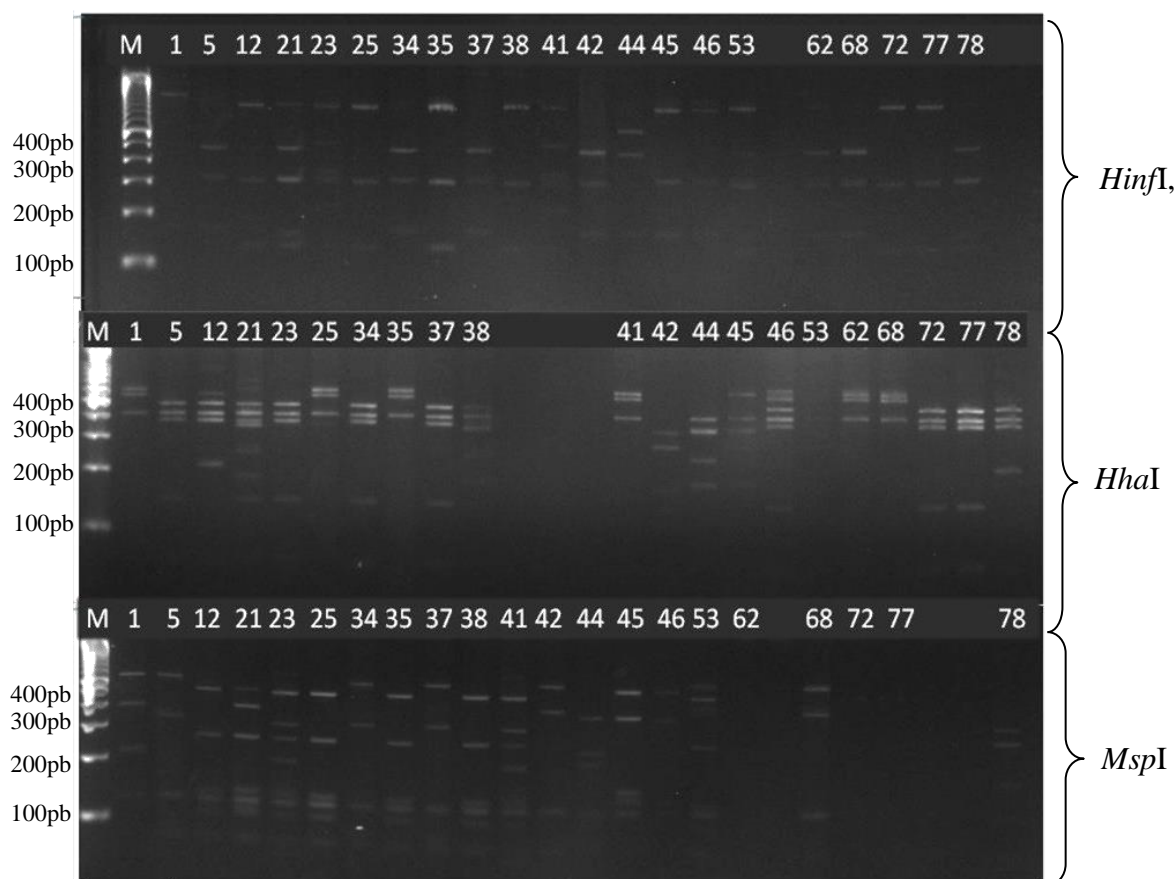


Figura 3.3. Perfis de restrição do gene 16S rRNA de isolados de rizóbios nativos utilizando as endonucleases *HinfI*, *HhaI* e *MspI*. (M - marcador de peso molecular de 100pb).

Na matriz de dissimilaridade gerada pelo complemento do coeficiente de Jaccard (Tabela 3.3), em média, a distância entre os pares de genótipos foi de 0,56. Destacaram-se como os pares mais divergentes os isolados DPP1 e MTP44, com distancia de 0,89 e os mais similares MTP72 e MTBV77 com distância de 0,10. Com esses resultados pode-se inferir que, a maior divergência entre os isolados bacterianos está relacionada com espécie botânica da qual foram isolados e não do solo em que foram cultivados, pois os isolados de rizóbios mais divergentes são provenientes do solo da mesma área (Município de Pocinhos – PB) e nativos de plantas iscas diferentes, já os isolados mais similares foram cultivados em solo de regiões diferentes, porém, derivam da mesma espécie botânica (*Mimosa tenuiflora*).

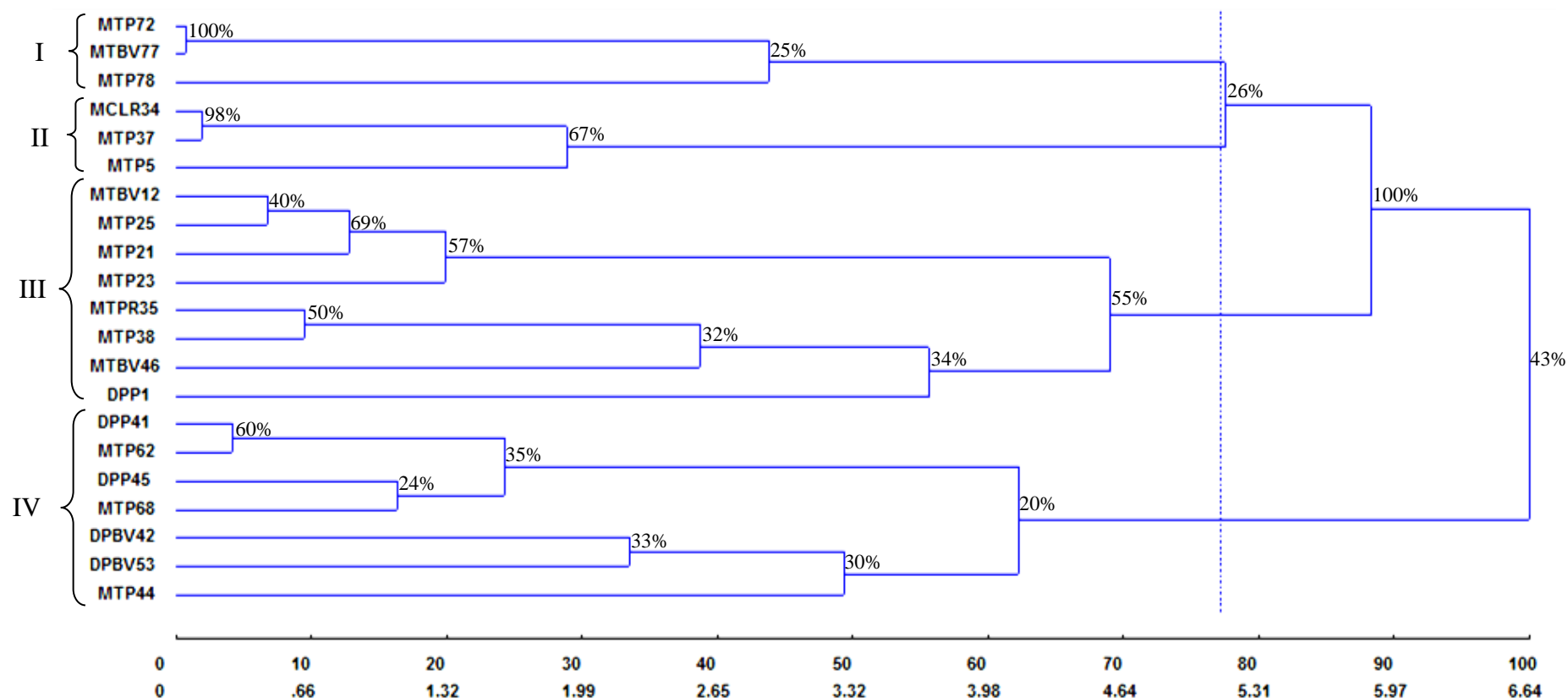


Figura 3.4. Dendrograma de dissimilaridade entre os isolados de rizóbios, gerado a partir da matriz de dissimilaridade pelo método de agrupamento de Ward, com o número de grupos definido pelo método de Mojena, onde o ponto de corte = média + kDP, $k = 1,25$. Valores em porcentagem nas bifurcações da matriz representa a robustez da análise filogenética através do Bootstrap.

As medidas de distâncias genéticas, obtidas para a formação do agrupamento, variaram de 0,10 a 0,89, sugerindo que os isolados nativos selecionados nesse estudo têm uma ampla diversidade genética.

Os rizóbios nativos foram agrupados em dendrograma (Figura 3.4) pelo método de Ward. Para avaliar o grau de ajuste da matriz de dissimilaridade e a formação do dendrograma, foi estimado o coeficiente de correlação cofenética (CCC). Quanto maior o valor do coeficiente, menor é a distorção provocada ao se agrupar os genótipos (Arriel et al., 2006). Os perfis de restrição do gene 16S rRNA de isolados de rizóbios nativos utilizando as endonucleases *Hinf*I, *Hha*I e *Msp*I foram agrupados em quatro grupos à 78% de dissimilaridade. O CCC foi de 80%, distorção de 1.2 e estresse de 11%. O agrupamento foi claramente influenciado pela espécie botânica de origem das bactérias. O grupo I abrigou os isolados da *Mimosa tenuiflora*. Já o grupo II reúne outros isolados de *Mimosa tenuiflora* e o único representante da espécie *Mimosa caesalpinifolia*. No grupo III além dos isolados de *Mimosa tenuiflora*, o primeiro isolado de *Desmanthus pernambucanus* aparece no fim do grupo, próximo do último grupo (IV), onde se reúnem os demais isolados provenientes dessa espécie.

Na representação tridimensional na análise de componentes principais dos 21 genótipos (Figura 3.5) observamos a formação de três grandes grupos. É evidente o agrupamento dos isolados provenientes de *Desmanthus pernambucanus* em relação aos demais.

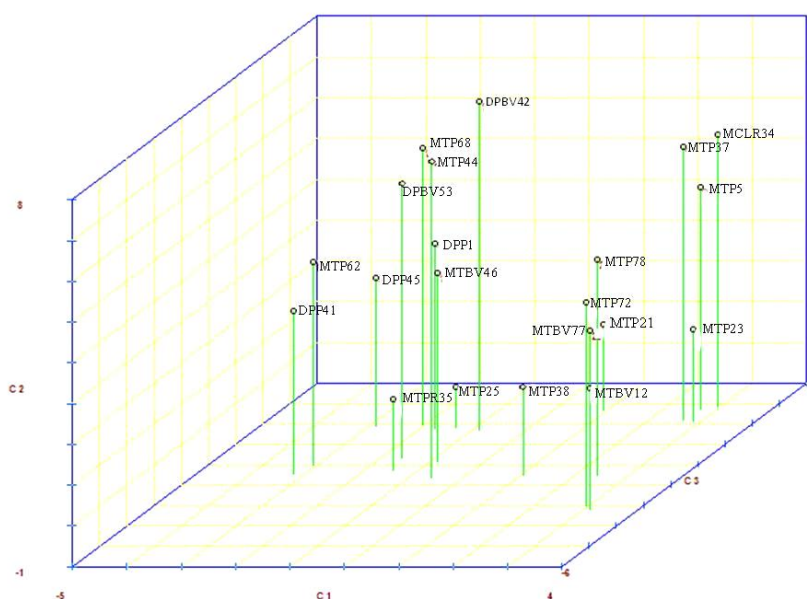


Figura 3.5. Representação tridimensional na análise de componentes principais, baseado na matriz de dissimilaridade entre os isolados de rizóbios obtidos através dos perfis de restrição do gene 16S rRNA utilizando as endonucleases *Hinf*I, *Hha*I e *Msp*I.

A síntese microbiana de Compostos Indólicos (CIs) tem sido conhecida há muito tempo. É relatado que 80% dos microorganismos isolados da rizósfera, de várias culturas, possuem a capacidade de sintetizar e liberar auxinas como metabólitos secundários (Ahemad & Kibret, 2014). Geralmente, o Ácido Indol Acético (AIA) secretado por rizobactérias interfere em muitos processos de desenvolvimento da planta porque o grupo endógeno da planta pode ser alterado pela aquisição de fitormônio secretado por bactérias do solo.

Os isolados de rizóbios produziram diferentes quantidades de CIs, como pode ser observado nas figuras (3.6 e 3.7). A produção do fitormônio foi maior nas amostras onde houve acréscimo de L-triptofano, precursor do ácido-indol-acético, pelas bactérias MTBV12, MTBV77, MTP78 e MTP37. Ou seja, 4 das 5 estirpes que amplificaram simultaneamente os genes *nifH* e *nodC*, evidenciando uma relação entre a expressão desses genes na síntese de CIs. MTBV77 e MTP37 além de expressar dois genes e produzir grandes quantidades de CI, também são tolerantes a estresses salino, alumínio e variação de pH.

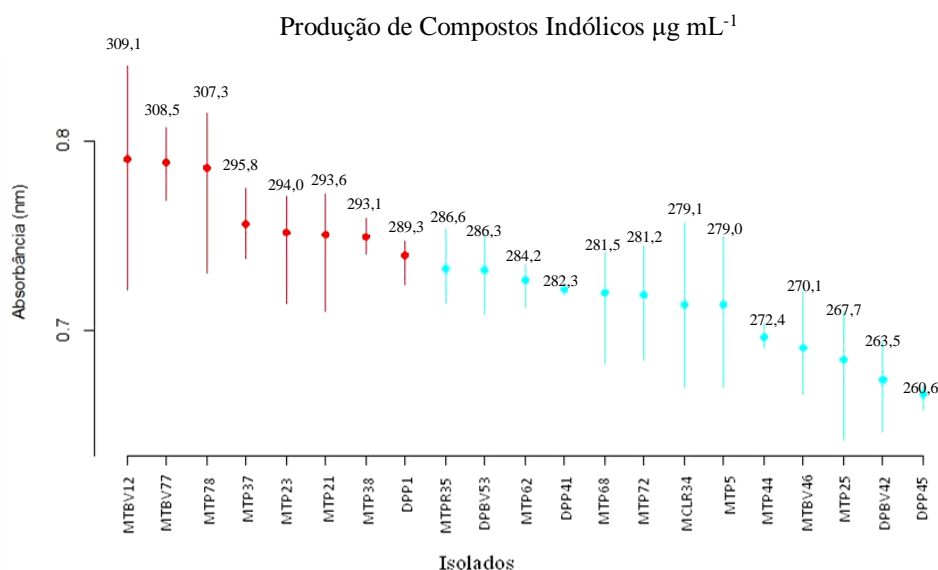


Figura 3.6. Produção de compostos indólicos “*in vitro*”, com L-triptofano, por isoladas de rizóbios nativos. Resultados em cores distintas diferem estatisticamente pelo teste Scotknot 5%.

Esses isolados produziram respectivamente 309,1; 308,5; 307,3 e 295,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de compostos indólicos. Segundo Souza et al. (2015), a síntese de CIs em bactérias depende da presença de precursores em exsudados radiculares. Entre os vários exsudados, o L-

triptofano foi identificado como o principal precursor para a via da biossíntese de CIs nas bactérias. A caracterização de compostos intermediários levou à identificação de diferentes caminhos que usam L-triptofano como principal precursor.

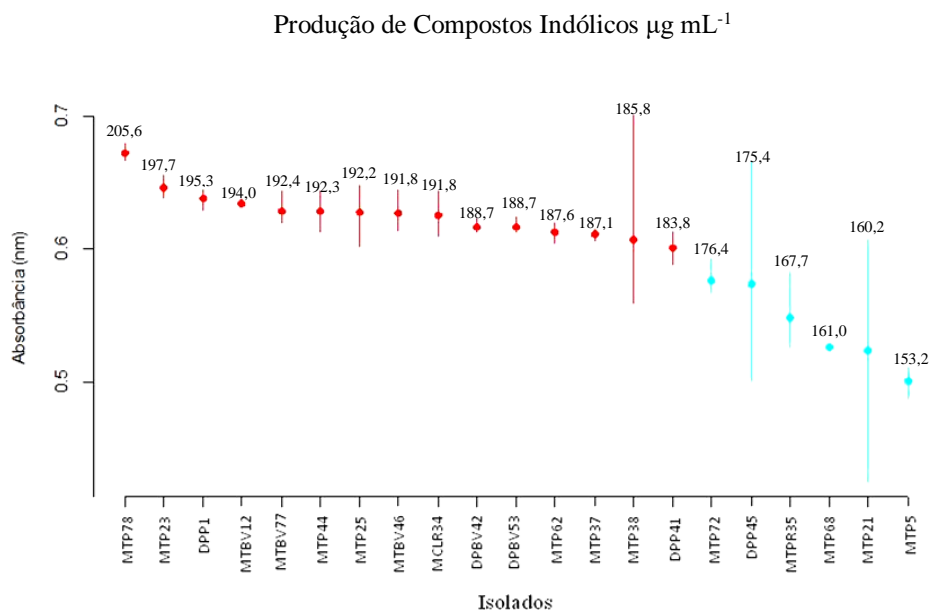


Figura 3.7. Produção de compostos indólicos “*in vitro*”, sem L-triptofano, por isoladas de rizóbios nativos. Resultados em cores distintas diferem estatisticamente pelo teste Scotknot 5%.

Os diferentes caminhos da síntese do Ácido Indol Acético (AIA) nas bactérias mostram um alto grau de similaridade com as vias de biossíntese do AIA em plantas. As bactérias benéficas predominantemente sintetizam AIA através da via do ácido indol-3-pirúvico, uma via alternativa dependente em L-triptofano (Spaepen et al., 2007).

Os isolados que produziram a maior quantidade de compostos indólicos na ausência de L-triptofano foram, MTP78, MTP23, DPP1, MTBV12 que produziram respectivamente 205,6; 197,7; 195,3 e 194,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A variação de produção de compostos indólicos pelos isolados nativos, com e sem precursor do ácido-indol-acético, oscilou entre 153,2 e 309,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

De acordo com Machado et al. (2013), estudando a produção de compostos indólicos e o efeito da inoculação dos rizóbios em gramíneas forrageiras, puderam relatar que todos os rizóbios foram capazes de produzir CIs, mesmo num ambiente com pequena concentração de L-triptofano e quando suplementados com esse precursor a capacidade de produção foi elevada, sendo a maior quantidade observada de 171,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e todos rizóbios avaliados também promoveram o crescimento de vegetal. Halda-Alija (2003),

observaram em seu experimento que algumas espécies bacterianas diazotróficas foram capazes de produzir CIs na ausência de L-Triptofano, corroborando os resultados encontrados neste trabalho.

3.4 Conclusão

A amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* é eficiente na autenticação de rizóbios e proporciona maior economia de tempo e recursos laboratoriais.

Os isolados de rizóbios nativos tem alta diversidade genética e se agrupam com base na planta isca da qual são isolados.

A produção de Compostos indólicos é variável entre os isolados selecionados e é potencializada na presença do precursor L-Triptofano. Os isolados que produziram maiores quantidades de CIs foram bactérias nativas da fabácea *Mimosa tenuiflora*.

Bibliografia

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University-Science**. v.26, n.1, p.1- 20, 2014.

ARRIEL, N. H. C.; MAURO, A. O.; MAUR, S. M. Z.; BAKKE, O. A.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; COSTA, M. M.; CAPELOTO, A.; CORRADO, A. R. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.41, n.5, p.801-809, 2006.

BOAKYE, E.Y.; LAWSON, I. Y. D.; DANSO, S. K. A.; OFFEI, S. K. Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. **Symbiosis - Springer**. 2016. DOI: DOI 10.1007/s13199-016-0383-1.

BONTEMPS, C.; ROGEL, M. A.; WIECHMANN, A.; MUSSABEKOVA, A.; MOODY, S.; SIMON, M. F.; MOULIN, L.; ELLIOTT, G. N.; LACERCAT-DIDIER, L.; DASILVA, C.; GREYER, R.; CAMARGO-RICALDE SL; CHEN, W.; SPRENT, J. I.; MARTÍNEZ- ROMERO, E.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Endemic Mimosa species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. **New Phytol**. v.10, p.1111–13573, 2015.

EFROSE, R. C.; ROSU, C. M.; STEDEL, C.; STEFAN, A.; SIRBU, C.; GORGAN, L. D.; LABROU, N. E; FLEMETAKIS, E. Molecular diversity and phylogeny of indigenous Rhizobium leguminosarum strains associated with Trifolium repens plants in Romania. **Springer**. 2018. DOI 10.1007/s10482-017-0934-3

ELLIOTT, G.N.; CHEN, W.M.; CHOU J.H.; WANG. H.C.; SHEU. S.Y.; PERIN, L.; REIS, V.M.; MOULIN. L.; SIMON, M.F.; BONTEMPS, C. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa spp.* and fixes nitrogen ex planta. **New Phytologist**. v.173, p.168–180, 2007.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; SANTOS, C. A. F.; CUNHA, J. B. A.; MARTINS, L. M. V. **Duplex PCR para a Amplificação Simultânea de Fragmentos dos Genes nifH e nodC em Bactérias Isoladas de Nódulos de Leguminosas**. Petrolina: Embrapa Semiárido, Comunicado técnico: 158, 6 p. 2013.

HALDA-ALIJA, L. Identification of índole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with Juncus effusus L. Cambridge. **Journal of Microbiology**. v. 49, p.781-787, 2003.

JACCARD, P. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. **Bulletin de la Societt vaudoise des Sciences Naturelles**, 37:547-579, 1901.

LAGUERRE, G.; NOUR, S.M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v.147, n.4, p.981-993, 2001.

LI, D.; ZHANG, Q.; XIAO, K.; WANG, Z.; WANG, K. Divergent responses of biological nitrogen fixation in soil, litter and moss to temperature and moisture in a karst forest,

southwest China. **Soil Biology and Biochemistry**. v.118, p.1-7, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.11.026>

MACHADO, R. G.; SÁ, E. L. S.; BRUXEL, M.; GIONGO, A.; SANTOS, N. S.; NUNES, A. S. Indoleacetic Acid Producing Rhizobia Promote Growth of Tanzania grass (*Panicum maximum*) and Pensacola grass (*Paspalum sauriae*). **International Journal Of Agriculture & Biology**. v.15, n.5, 2013.

MOJENA, R. Hierárquical grouping method and stopping rules: an evaluation. **Computer Journal**, v.20, p.359-363, 1977.

MOTHAPO, N.; GROSSMAN, J. M.; MAUL, J. Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch genotypes. **Applied Soil Ecology**. v.64, p.201-213, 2013.

SANTOS, S. N.; KAVAMURA, V. N.; SILVA, I. S. M.; ANDROEOTE, F. D., Plant Growth Promoter Rhizobacteria in Plants Inhabiting Harsh Tropical Environments and Its Role in Agricultural Improvements. D.K. Maheshwari (ed.). **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**, Microbiology Monographs, 2010.

SARWAR, M.; KREMER, R. J.; Determination of bacterially derived auxin using microplate method. **Lett Appl Microbiol**. v.20, p.282–285, 1995.

SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P.; Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**. v.38, n.4, p.401-419, 2015.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**. v31, p.425-448, 2007.

STEFAN, A.; CAUWENBERGHE, J. V.; ROSUA, C. M.; STEDELA, C.; LABROUD, N. E.; FLEMETAKISE, E.; EFROSE, R. C. Genetic diversity and structure of *Rhizobium leguminosarum* populations associated with clover plants are influenced by local environmental variables. **Systematic and Applied Microbiology**. 2018. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.01.007>

VINCENT, J. M. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford, **Blackwell Scientific Publications** 164p, 1970.

WARD, J. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of American Statistical Association**, v.58, p.236-244, 1963.

ZOU, L.; CHEN, Y. X.; PENTTINEN, P.; LAN, Q.; WANG, K.; LIU, M.; PENG, D.; ZHANG, X.; CHEN, Q.; ZHAO, K.; ZENG, X.; XU, K.W. Genetic Diversity and Symbiotic Efficiency of Nodulating Rhizobia Isolated from Root Nodules of Faba Bean in One Field. **Plos One**. v.11, n.12, 2016. doi:10.1371/ journal.pone.0167804.